

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS

Inmovilización de lacasas de *Trametes versicolor* en nanoestructuras tipo *core shell* De $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ para la degradación de ciprofloxacino

Por:

Q.F.B. EVELYN GUADALUPE BECERRA CASTILLO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestra en Ciencias con orientación
en Microbiología Aplicada.**

Febrero, 2021

“Inmovilización de lacasas de *Trametes versicolor* en nanoestructuras tipo *core shell* De $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ para la degradación de ciprofloxacino”

Aprobación de la tesis

DRA. ALCIONE GARCÍA GONZÁLEZ
PRESIDENTE

SECRETARIO

VOCAL

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS
SUB-DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“Inmovilización de lacasas de *Trametes versicolor* en nanoestructuras tipo *core shell* De $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ para la degradación de ciprofloxacino”

Comité tutorial

DRA. ALCIONE GARCÍA GONZÁLEZ
ASESOR

DR. REFUGIO BERNARDO GARCÍA REYES
COASESOR

DR. XRISTO ZARATE KALFÓPULOS
COMITÉ TUTORIAL

DR. JESÚS ALBERTO GÓMEZ TREVIÑO
COMITÉ TUTORIAL

DR. JOSÉ RUBÉN MORONES RAMÍREZ
COMITÉ TUTORIAL

RESUMEN

Evelyn Guadalupe Becerra Castillo

Fecha de grado: Febrero 2021

Universidad autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: “Inmovilización de lacasas de *Trametes versicolor* en nanoestructuras tipo *core shell* De $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ para la degradación de ciprofloxacino”

Número de páginas: 54

Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias
con Orientación en Microbiología Aplicada

Área de estudio: Microbiología Aplicada

Propósito y método de estudio:

En este trabajo se realizó la producción de lacasas por fermentación sumergida de *Trametes versicolor*, posteriormente se purificaron parcialmente por precipitación con sales de sulfato y ultrafiltración, se inmovilizaron en nanoestructuras *core shell* de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_4$, las cuales fueron previamente sintetizadas y funcionalizadas. Se evaluó la degradación de ciprofloxacino en solución, con la enzima libre e inmovilizada en presencia de ABTS como mediador redox.

Conclusiones y contribuciones:

Los resultados de SEM y SEM-EDS de las nanopartículas indicaron un diámetro promedio de 63.3 nm para *core* y un *shell* aproximado de 31 nm de espesor. Mediante la determinación del potencial Z, se observó un cambio en la distribución de la carga eléctrica según el proceso de síntesis y funcionalización de las partículas, de -23.1 mV a 13.4 mV, lo que indica la adición de los grupos aminos al material. Con los resultados de XPS se encontraron Fe, O, Si, C y N, en el material ya funcionalizado, lo que indica la incorporación del Shell de SiO_2 y del APTES.

Las enzimas lacasas fueron obtenidas por la fermentación en medio líquido de *Trametes versicolor*, determinando una actividad enzimática del extracto de 1,386.15 U/mL a los 9 días de fermentación. El extracto enzimático rico en lacasas

fue parcialmente purificado por ultrafiltración para dejar la fracción entre 30 y 100 kDa con una actividad enzimática final de 1,538.89 U/mL. Una vez funcionalizadas las nanopartículas con NH₂ se inmovilizaron enzimas lacasas de *Trametes versicolor* en el material, logrando un 68% de porcentaje de retención. Por último se llevó a cabo la degradación del ciprofloxacino con las lacasas inmovilizadas, usando ABTS como mediador redox y se cuantificó por HPLC con un detector de UV-Vis, sin embargo bajo las condiciones trabajadas, no se lograron separar los picos de los subproductos, ya que son muy similares a los del Ciprofloxacino, y se duplica el área de los picos, por lo que se recomienda en un futuro usar HPLC acoplado a un detector de masas.

Firma del asesor: _____

Dra. Alcione García González

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por beca de manutención otorgada a lo largo de veinticuatro meses, al igual que la beca de movilidad, esta última para realizar una estancia de investigación en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), y al Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), a cuyos institutos también externo un agradecimiento.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Químicas, por cada una de las facilidades para la realización de este proyecto de investigación y por brindarme la oportunidad de ser una orgullosa “alumna-UANL”.

A mi asesora la Dra. Alcione García González y a mi coasesor el Dr. Bernardo García Reyes, por darme su confianza al poner en mis manos este trabajo de investigación. Por compartir conmigo no solo sus conocimientos en lo académico, sino también, en lo personal. Agradezco a la fundación “García-García”, de donde me llevo aprendizaje, apoyo y momentos felices con cada uno de los miembros.

A mis compañeros de laboratorio, Iris Arvizu, Monserrath Atilano, Andreanni Villanueva y Sergio Canul, quienes de muchas maneras pusieron un granito de arena para lograr concluir con el proyecto.

A mis padres, el Ing. Demetrio Becerra Hernández y la Profa. Elia Castillo Castro, porque desde hace 26 años han desempeñado la profesión que mejor saben, la de ser papás. Porque con trabajo y esfuerzo me dieron comodidades, sorpresas, pero, sobre todo, educación. Porque en casa nunca hubo para mí un “NO”, sino solo, confianza para llegar hasta donde hoy he logrado escalar, siempre de su mano.

A mi hermana, Kathya y a mi gran compañero, Juan Luis, porque, aunque no lo parezca, la obtención de este título también es gracias a ustedes. Este camino no sería lo mismo sin ustedes a mi lado.

DEDICATORIA

A mis padres

Por darme las herramientas, el carácter y los valores necesarios para afrontar la vida. Por darme la libertad de cumplir mis planes, que con el paso del tiempo se convirtieron en objetivos, y con madurez los pude convertir en metas.

Y este Master en ciencias, es una de ellas.

INDICE

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN	14
--------------------	----

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO.....	17
2.1.1 Contaminantes emergentes	17
2.1.2 Antibióticos.....	19
2.1.3 Principios activos en los ecosistemas	21
2.1.4 Tratamientos de aguas residuales	22
2.1.5 Tratamientos con hongos basidiomicetos	24
2.1.6 Enzimas	24
2.1.7 Lacasas.....	25
2.1.8 Tipos de inmovilización	26
2.1.8.1 Inmovilización covalente	26
2.2 Antecedentes	27
2.3 Análisis crítico	28
2.4. Aportación Científica	28

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	29
3.1 Hipótesis	29
3.2 Objetivos y Metas	29
3.2.1 Objetivo General	29
3.2.2 Objetivos específicos	29
3.2.3 Metas de Investigación	29
3.2.4 Metas Académicas.....	29

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1 Ubicación de equipo y material	30
4.2 Metodología	30
4.2.1 Propagación de la cepa fúngica de <i>Trametes versicolor</i>	30
4.2.2 Producción de lacasas por fermentación sumergida	30
4.2.3 Determinación de la actividad enzimática	31
4.2.4 Cuantificación de proteína extracelular	31
4.2.5 Evaluación de azúcares reductores (método de Miller)	31

4.2.6 Determinación de compuestos fenólicos	32
4.2.7 Precipitación con sulfato de amonio	32
4.2.8 Ultrafiltración	32
4.2.9 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.....	32
4.2.10 Preparación de nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	33
4.2.11 Modificación química de la superficie	33
4.2.12 Caracterización de las nanoestructuras tipo Core Shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. 33	
4.2.13 Inmovilización	35
4.2.14 Degradación de Ciprofloxacino.....	35
4.2.15 Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	35
4.3 Disposición de los residuos generados.....	35
CAPÍTULO 5	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
5.1 Propagación de la cepa fúngica.....	36
5.2 Producción de lacasas por fermentación sumergida	36
5.3 Concentración de lacasas por precipitación con sales y ultrafiltración.....	39
5.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.....	40
5.5 Evaluación de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ como soporte para inmovilización de lacasas	41
5.6 Síntesis, funcionalización y caracterización de nanoestructuras tipo <i>core shell</i> de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2\text{-NH}_2$	42
5.6.1 SEM	42
5.6.2 TEM.....	45
5.6.3 DRX	45
5.6.4 Espectroscopia por infrarrojo FTIR-ATR.....	46
5.6.5 XPS.....	47
5.6.6 Potencial ζ	48
5.3 Inmovilización de lacasas en las nanoestructuras <i>core shell</i> sintetizadas. 50	
5.7.15 Degradación y determinación de ciprofloxacino por HPLC	51
CAPÍTULO 6	
CONCLUSIONES.....	52
6.1 Recomendaciones y perspectivas a futuro	52
BIBLIOGRAFÍA	533

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de contaminantes emergentes

Tabla 2. Comparación entre actividades enzimáticas (U/mL) y proteína extracelular (mg/mL) en cada paso de la purificación.

Tabla 3. Porcentajes de elementos presentes en las nanopartículas.

Tabla 4. Distribución las cargas para Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$

Tabla 5. Tabla comparativa entre actividad enzimática inicial (U/mL), actividad enzimática final (U/mL), capacidad de retención (U/g) y porcentaje de retención de lacasas inmovilizadas (%)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Propagación de *Trametes versicolor* en placa Petri con agar extracto de malta.

Figura 2. Relación entre la concentración de azúcares reductores y la actividad enzimática de lacasa en el medio.

Figura 3. Relación entre la concentración de proteína extracelular y la actividad enzimática de lacasa en el medio.

Figura 4. Relación entre la concentración de compuestos fenólicos y la actividad enzimática de lacasa en el medio.

Figura 5. Gel de electroforesis revelando el peso molecular de Lacasa liofilizada comercial (Lac C.) y Lacasa semipurificada (Lac SP.)

Figura 6. Evaluación de la actividad enzimática de lacasas inmovilizadas en distintos pH

Figura 7. Evaluación de la actividad enzimática de lacasas a pH 4.5 y pH 7 a diferentes temperaturas

Figura 8. Micrografía electrónica de barrido de Fe_3O_4

Figura 9. Micrografía electrónica de barrido de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2$

Figura 10. Micrografía electrónica de barrido con espectro elemental de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2$

Figura 11. Micrografía electrónica de transmisión $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2$

Figura 12. Difractograma de Fe_3O_4 con $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2$

Figura 13. Espectro de FT-IR de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2$ en distintos puntos de la síntesis.

Figura 14. Espectro de XPS de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2\text{-NH}_2$

Figura 15. Concentración de ciprofloxacino en partes por millón vs tiempo en horas, en la biotransformación con lacasas libres e inmovilizadas.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS Ácido 2,2 azino bis (3-etilbenzo tiazolin-6 sulfónico)

ADN Acido desoxirribonucleico

APTES (3-aminopropil) trietoxisilano

cm Centímetros

DEAE Dietilaminoetilcelulosa

DRX Difracción de rayos X

DNS 3,5-dinitrosalicilato

EDS Espectroscopia de dispersión de energía de rayos X

FTIR-ATR Espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier con reflexión total atenuada

g Gramos

g/L Gramos por litro

h Horas

HPLC Cromatografía líquida de alta resolución

kDa Kilodalton

kHz Kilohertz

kV Kilovoltio

L Litros

M Molar

mA Miliamperios

mg Miligramos

mgL⁻¹ Miligramos por litro

min Minutos

mL Mililitros

mM L⁻¹ Milimolar por litro

nm Nanometros

pH Potencial de Hidrogeno

ppb Partes por billón

ppm Partes por millón

psi Libra por pulgada cuadrada

rpm Revoluciones por minuto

s Segundos

SEM Microscopía electrónica de barrido

SDS-PAGE Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida

TEOS Tetraetilortosilicato

U/g Unidades de actividad enzimática por gramo

U/mL Unidades de actividad enzimática por mililitro

U/mg Unidades de actividad enzimática por miligramo

UV-VIS Ultravioleta visible

W Watts

ξ Coeficiente de extinción molar

° C grados Celsius

λ longitud de onda

> Mayor a

μL Microlitros

% Porcentaje

ζ zeta

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El desarrollo industrial y el crecimiento poblacional del último siglo, han traído como consecuencia la acumulación de compuestos que provocan daño en el medio ambiente y a la salud. Recientemente, se ha logrado detectar sustancias que siempre han estado presentes en diversas partes del ambiente, pero que hasta la fecha habían pasado desapercibidas por las escasas técnicas para su adecuada identificación, dichos compuestos reciben el nombre de “contaminantes emergentes”. Se conocen como contaminantes emergentes a un vasto grupo de compuestos que provienen de diferente origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente y los daños que ocasionar, han sido ignorados. Entre estas sustancias se encuentran productos como: fármacos, plaguicidas, cosméticos, artículos de limpieza y aseo personal entre otros^{1,2}.

Su presencia constante es altamente dañina al ambiente y pueden causar daños ambientales que pueden desencadenar en problemas para la salud, esto debido a que son un grupo de compuestos actualmente no regulados, ya que para su mayoría no hay datos disponibles de su ecotoxicidad¹. Por esta razón, es necesario continuar con las investigaciones que permitan conocer el impacto que provocan, tanto al medio ambiente como al organismo humano.

Su principal problema es que son sustancias tóxicas bioacumulables, capaces de llegar incluso a los reservorios de agua de consumo humano a través de las vertientes residuales y corrientes subterráneas. Las técnicas actuales de tratamiento no son adecuadas o bien son muy caras y su aplicación a escala industrial está muy imitada.

En el caso de los fármacos comunes, en especial los antibióticos, nos enfrenta a una liberación en el medio ambiente, tanto en agua, como suelo. Además, la exposición constante a baja concentración de antibióticos puede apoyar la proliferación de bacterias resistentes². Se estima que aproximadamente 3/5 partes de un antibiótico es metabolizado por el organismo, el resto es excretado³.

Uno de los antibióticos más utilizados en la actualidad es el ciprofloxacino, el cual es una quinolona de segunda generación de amplio espectro, con una marcada actividad contra bacterias gram positivas y gram negativas⁴. El ciprofloxacino es probablemente el antibiótico más abundante detectado en biosólidos municipales, debido a su abundante uso y sus propiedades de sorción⁵. Para combatir la presencia de estos contaminantes emergentes como el ciprofloxacino en aguas residuales, se han empleado distintas técnicas de remoción.

Los métodos empleados para el tratamiento de contaminantes pueden clasificarse en: tratamientos físicos (filtración), químicos (ozonación, oxidación convencional),

fisicoquímicos (coagulación-floculación, adsorción), tratamientos biológicos (lodos activados, hongos y enzimas)⁶.

Los tratamientos biológicos se basan en emplear microorganismos, principalmente bacterias, los cuales utilizan los contaminantes de los efluentes, como sustrato o nutrientes para su crecimiento⁷. Estos tratamientos deben contar con condiciones ambientales específicas, que permitan el desarrollo del microorganismo empleado⁸. La mineralización que tiene lugar en estos tratamientos, es un proceso destructivo que transforma los contaminantes en agua, dióxido de carbono, hidrógeno, metano y nitrógeno molecular⁹. Sin embargo, tienen bajas eficiencias en fármacos como los antibióticos, por su naturaleza, por lo que es necesario utilizar microorganismos como los hongos, especialmente los hongos de pudrición blanca¹⁰.

Un enfoque verde para la eliminación de residuos farmacéuticos, en especial los antibióticos considerados contaminantes emergentes, es el basado en hongos de la pudrición blanca¹⁰, específicamente los productores de enzimas ligninolíticas extracelulares como las lacasas, manganeso peroxidasas y lignina peroxidasas¹¹.

Las enzimas ligninolíticas participan en la oxidación de la lignina en subunidades de compuestos aromáticos¹². Estas enzimas son inespecíficas a un sustrato y tienen el potencial de oxidar un amplio espectro de compuestos¹³. Recientemente se ha visto un aumento de esta aplicación para la degradación de un gran número de contaminantes emergentes. Sin embargo la aplicación de estas enzimas como enzimas libres, es limitada debido a su falta de reutilización y a su inestabilidad a altas temperaturas y valores amplios de pH, así como en presencia de disolventes orgánicos¹⁴. Una alternativa para mejorar la estabilización enzimática y hacer el tratamiento enzimático más verde y reutilizar en varios ciclos las enzimas, es inmovilizar.

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio para dar lugar a formas insolubles, las cuales retienen su actividad catalítica y pueden ser reutilizadas repetidamente, lo que abre las puertas a que las enzimas tengan aplicaciones industriales.

Los procesos de inmovilización presentan ventajas tales como, aumento de la estabilidad de la enzima, reutilización de la enzima inmovilizada (por lo que disminuyen los costos del proceso) y la posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada.

Sin embargo, algunas de las desventajas que presenta este método son, la alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo, la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte y la posible pérdida de actividad enzimática durante la inmovilización.

Considerando tanto las ventajas como las desventajas anteriores, el hecho de que a la enzima se le abra la posibilidad de ampliar su uso sobre todo a escala industrial, y que disminuya el costo del procedimiento, la inmovilización emerge como un

proceso rentable si se desea trabajar con enzimas. El tipo de inmovilización a usar es un paso transcendental, por lo que es necesario elegir adecuadamente el método que cumpla con las condiciones que son requeridas según sea el caso. Existen métodos físicos de inmovilización enzimática (como la adsorción y el atrapamiento) y los métodos químicos, como la formación de enlaces covalentes entre el soporte y la enzima¹⁵. El enlace covalente comienza con la síntesis y la funcionalización de los soportes, uno de los soportes más atractivos para la inmovilización son los compuestos magnéticos, ya que permiten una fácil separación del sistema enzimático del efluente tratado, lo que facilita la reutilización y ayuda a mantener íntegro el biomaterial porque no hay daño mecánico.

En el presente trabajo, se llevará a cabo la degradación de ciprofloxacino, por la acción de enzimas lacasas, producidas a partir de un hongo de pudrición blanca (*Trametes versicolor*), las cuales serán caracterizadas e inmovilizadas en un soporte microestructurado tipo *core shell* de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, lo que permitirá reutilizar el biomaterial en varios ciclos de remoción del ciprofloxacino, lo que nos generará un proceso de remoción aún más verde.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

El agua es uno de los principales recursos naturales, indispensable para la vida, la cual ha sufrido una lenta, pero alarmante escasez, esto como consecuencia del rápido desarrollo humano y de mal uso¹⁶. La calidad, a su vez, es incluso un problema mayor. Como ambos aspectos están vinculados, podemos decir que, el uso excesivo de este recurso disminuirá la cantidad de agua disponible para uso y a su vez aumentará la concentración de contaminantes, lo que conlleva a un aumento en los riesgos a la salud para la población. Algunos investigadores estiman que cuatro quintas partes de todas las enfermedades y un tercio de las muertes en los países en desarrollo, se pueden imputar a la mala calidad del agua¹⁷.

2.1.1 Contaminantes emergentes

Dentro de los contaminantes presentes en el agua, podemos encontrar aquellos llamados contaminantes emergentes, los cuales se definen como un grupo de contaminantes no reconocidos como tal, su presencia en el medio ambiente no es completamente nueva, pero si implica un grado de preocupación debido a las posibles consecuencias por su presencia¹. En la actualidad su presencia e impacto en los distintos espacios ambientales, han sido poco estudiados, por esta razón la mayoría no están regulados y los métodos de análisis y eliminación son bastante limitados¹⁶.

De la misma manera que el crecimiento poblacional afecta a la disponibilidad de agua dulce, este, también contribuye al alza del consumo de sustancias y productos, que al final de su vida útil, dichos compuestos van a parar a las aguas naturales y suelos de uso agrícola. En muchas ocasiones las plantas de tratamiento de agua no son aptos para degradar estos desechos, ya que se encuentran diseñadas para eliminar contaminantes habituales requeridos por la legislación vigente. Por lo que, los contaminantes emergentes se pueden encontrar presentes en aguas superficiales, subterráneas y de consumo humano.

Una característica de este grupo de contaminantes es que no es necesario que sean permanentes en el ambiente para causar efectos negativos, ya que, su constante consumo y, por ende, su excreción, deriva en su persistente introducción y presencia en el medio ambiente¹⁸.

Existe un amplio grupo de contaminantes emergentes, algunos de ellos se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Tipos de contaminantes emergentes ¹⁹.

Contaminantes	Ejemplo
Productos farmacéuticos (antibióticos)	Trimetoprima, eritromicina, lincomicina, sulfametoxazola, ciprofloxacino
Medicamentos analgésicos y anti-inflamatorios	Codeína, ibuprofeno, acetaminofeno, ácido acetilsalicílico, diclofenaco
Medicamentos psiquiátricos	Diazepam, fluoxetina, carbamazepina
Betabloqueadores	Metoprolol, propanolol, timolol, atenolol
Esteroides y hormonas (anticonceptivos)	Estradiol, estrona, estriol, dietilelbestrol
Productos de cuidado personal	Fragancias, policíclicos y macrocíclicos
Agentes de protección solar	Benzofenona, metilbenzilidene cambor
Repelentes de insectos	N,N-dietiltoluamida
Antisépticos	Triclosán, clorofeno
Detergentes tensioactivos y sus metabolitos	Alquilfenoles etoxilados, alquilfenoles (nonilfenol, octilfenol), alquilfenol carboxilados
Retardadores de llama	Difenil éteres polibromados (PBDEs), tetrabromo bisfenol A, tris (2-cloroetil) fosfato
Aditivos y agentes industriales	Agentes quelantes (EDTA), sulfonados aromáticos
Aditivos de la gasolina	Dialquil éteres. Metil-t-bitil éter (MTBE)
Subproductos de desinfección	Bromoácidos, bromoacetonitrilos, bromoaldehidos, cianoformaldehido, bromato

En el caso especial de la presencia de antibióticos como contaminantes, el principal problema en el tratamiento convencional de agua, es el uso de lodos activados (bacterias aerobias o anaerobias), por lo que no se logra degradar el contaminante

y hace que este quede en los biosólidos, lo que entra en contacto directo con los mantos acuíferos y las zonas agrícolas, y podría generar resistencia a antibióticos.

2.1.2 Antibióticos

Los antibióticos se definen como molécula natural producida por un organismo vivo, hongo o bacteria, facultad de inducir la muerte o interrumpir el crecimiento microbiano²⁰.

Los antibióticos en general integran un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento de farmacocinética y farmacodinamia; su principal característica es ejercer una acción específica sobre algunas estructuras o funcionamiento del microorganismo²¹. El objetivo primordial es controlar y/o disminuir el número de viable de microorganismos, para que el sistema inmunológico sea capaz de eliminar el resto en su totalidad.

Los antibióticos se pueden catalogar según varios aspectos. El primero es el espectro de acción, de los cuales se conceptualizan dos tipos, los de amplio espectro, aquellos que son activos sobre un gran número de distintas especies y géneros; y los de espectro reducido, que son aquellos que solo son activos a un limitado grupo de especies. La segunda clasificación, es según el mecanismo de acción, el cual se define como el mecanismo utilizado para reprimir el crecimiento o el asolamiento de las bacterias, dentro de los cuales se encuentran los inhibidores de pared bacteriana, inhibidores de la síntesis proteica, inhibidores de la duplicación del ADN, inhibidores de la membrana citoplasmática y los inhibidores de vías metabólicas²².

Existe otra lista que determina si dichos antibióticos inhiben el crecimiento de los microorganismos (antibiótico bactericida) o si destruyen completamente (antibióticos bacteriostáticos). Dentro de los antibióticos bactericidas, encontramos β -lactámicos, glicéptidos, aminoglucósidos, polimixinas y quinolonas. Para los antibióticos bacteriostáticos tenemos las tetraciclinas, sulfonamidas y macrólidos²².

Para fines de la investigación buscamos centrarnos en los antibióticos bactericidas, en especial en el grupo de las quinolonas, los cuales son derivados de una molécula formada por un doble anillo el cual contiene un residuo de nitrógeno en posición 1, dicha molécula puede dar lugar a sustituciones que derivan en un compuesto específicos. Las quinolonas son antibióticos que actúan inhibiendo la ADN girasa, enzima que cataliza el superenrollamiento del ADN cromosómico, lo cual, en situaciones normales, asegura la división celular del microorganismo²³.

Este grupo de antibióticos al igual que otros, se clasifica por generaciones. Las quinolonas de primera generación tienen actividad hacia enterobacterias, son inactivas sobre grampositivas anaerobias. Alcanzan concentraciones séricas muy bajas, al igual que su distribución sistémica. Lo que deriva una concentración en orina alta, por lo que su empleo en infecciones urinarias es habitual. Las quinolonas fluoradas son las de segunda generación. En su molécula está incorporado un átomo de flúor, exhiben mayor actividad sobre bacterias gram negativas. Tienen una módica actividad hacia grampositivos, sin presentar actividad sobre anaerobios²⁴. Las concentraciones presentes en suero y tejidos son bajas, por lo cual se elude su uso en infecciones sistémicas. Las características particulares de las quinolonas de tercera generación, es que sostienen una actividad sobre gramnegativas y tienen una actividad mejorada hacia grampositivas. Por último, tenemos las de cuarta generación que además de la actividad contra gramnegativos, sustentan una actividad aumentada sobre grampositivos²³.

Con respecto a su farmacocinética, se sabe que las quinolonas son bien absorbidas tras su administración vía oral con una buena biodisponibilidad. Existe una similitud de concentraciones séricas tras vía de administración oral y vía intravenosa. La vida media plasmática oscila entre 1.5 y 16 horas. Su eliminación es fundamentalmente renal²².

Ahora bien, dentro de los antibióticos como las fluoroquinolonas de tercera generación, el ciprofloxacino es uno de los mayormente prescritos, debido a que está indicado para el tratamiento de infecciones como lo son de vías respiratorias, infecciones del tracto genitourinario, infecciones gastrointestinales, infecciones osteoarticulares, infecciones en piel y tejidos blandos, de vías biliares, entre muchas otras. En cuanto a su biodistribución, este se une en baja concentración a las proteínas, penetra con facilidad en los tejidos, en los cuales alcanza concentraciones que superan los niveles séricos correspondientes²⁵.

Se han encontrado pequeñas concentraciones de algunos metabolitos de esta quinolona, tales como desetilenciprofloxacino, sulfociprofloxacino, oxociprofloxacino y formilciprofloxacino. Los primeros tres poseen una actividad antibacteriana comparable o inferior al ácido nalidíxico. Para el formilciprofloxacino, en la menor cantidad, es ampliamente equivalente a norfloxacino en cuanto a actividad antimicrobiana refiere.

La molécula de ciprofloxacino se excreta ampliamente y sin modificar en la orina tanto por filtración glomerular como por secreción tubular y el 1% de la dosis se excreta vía biliar, por tanto, se encuentra en la bilis a elevadas concentraciones²⁵.

Tras una administración intravenosa, se ha demostrado, que solo 3/5 partes se metaboliza y entre 30% y 40% se obtienen en productos de residuos fisiológico,

dentro de los cuales un aproximado del 24% aparece como ciprofloxacino en orina y un 3.8% como metabolitos de este, en cuanto a la presencia de ciprofloxacino en heces un 6% se encuentra como molécula original y 1.04% como metabolitos. La vida media para la eliminación de ciprofloxacino es de 3-5 horas, tanto tras la administración oral como la intravenosa²⁶.

2.1.3 Principios activos en los ecosistemas

En nuestro país, los medicamentos de mayor consumo son los analgésicos y los antibióticos²⁷. Lo anterior debido a la prescripción excesiva y automedicación injustificada, especialmente de los antibióticos, su dispensación inadecuada y la falta de regulación sobre el adecuado y controlado desecho de medicamentos caducos.

Debido a las limitaciones de monitoreo y normativa para la utilización y deshecho de los medicamentos, es casi imposible evaluar la situación a la que se enfrenta el país sobre el uso de antibióticos. Lo que impide realizar una comparación entre México y otros países sobre el desarrollo de nuevas políticas aplicadas a los medicamentos²⁷.

Si bien se ha mencionado anteriormente las preocupaciones entorno a los medicamentos y antibióticos no representa únicamente el uso y prescripción inadecuada, sino que, va más allá de la ingesta en general.

Otro de los problemas que preocupa a la sociedad científica es la presencia de los principios activos de fármacos, la cual se dice que es una problemática relativamente nueva que ha causado un interés en los últimos años²⁸.

El primer indicio de la presencia de principios activos en efluentes, fue realizado en el año 1976 con una muestra tomada en la planta de tratamiento de aguas residuales *Big Blue River* en Kansas; en el cual se analizarán e identificaron algunos metabolitos de clofibrato y de aspirina²⁹.

Existen diversas formas por las cuales una sustancia activa derivada de un medicamento puede entrar a los ecosistemas, dentro de las cuales destacan, la excreción post consumo, la inadecuada disposición, los vertimientos provenientes de la industria farmacéutica y otras más que hacen uso de ellos, y el deshecho de medicamentos directamente sobre los cuerpos de agua³⁰.

El mayor problema o aquel que es considerado como la principal vía de entrada al ambiente es la excreción humana y veterinaria de los productos de transformación y desecho metabólico, así como un porcentaje del principio activo ³¹. Esto, debido a los altos niveles de consumo de ciertos medicamentos y a que después de ser

administrado, una parte de la sustancia original es liberada (orina, heces y otras secreciones), así como compuestos derivados del metabolismo

Pero si bien, por lo anterior no se puede realizar una modificación para cesar con la entrada al ambiente; existe una segunda vía de ingreso a los ecosistemas, la cual se trata de la mala disposición de medicamentos no deseados y/o vencidos, esto debido a la falta de educación e implementación de normativas relacionadas a este tema. Lo más común que sucede con este tipo de medicamentos es que son dispuestos junto con los residuos convencionales o directamente por la tarja, lo que hace que lleguen hasta los rellenos sanitarios y por filtración llegar hasta el subsuelo, y en los mantos acuíferos, respectivamente.

Se han realizado estudios en los cuales se logró detectar la presencia de éstos en aguas residuales, aguas superficiales, aguas subterráneas, aguas marinas, en agua potable, en suelo, en lodos de aguas residuales, en tejidos de animales que no han sido medicados, en tejidos vegetales e incluso en áreas remotas como los ambientes árticos ³².

Existen características con las cuales se crean los fármacos, como lo son, la solubilidad de estos en agua y de difícil degradación, lo que les permite transportarse en distintas matrices ambientales ³³. Pero la gravedad del problema no termina ahí, con la bioacumulación y la toxicidad existe la posibilidad de que otros organismos en el medio se vean afectados de distintas maneras. La creciente demanda de la sociedad para la descontaminación de aguas, la cual está cargada con partículas de diversos orígenes, ha impulsado, en la última década, al desarrollo de nuevas tecnologías de purificación ³⁴.

2.1.4 Tratamientos de aguas residuales

Un tratamiento al agua residual consta de un conjunto de operaciones físicas, biológicas y químicas, las cuales buscan eliminar la mayoría de los contaminantes posibles antes de su vertido, de tal manera que los niveles de contaminación restantes en el efluente tratados se encuentren dentro de los límites legales existentes, además de que puedan ser incorporados de forma natural por los cauces receptores ³⁴.

Dentro del proceso de tratamiento de aguas residuales encontramos tres tipos de tratamientos principales, los cuales son tratamiento primario, secundario y terciario.

El tratamiento primario, busca cumplir el objetivo de eliminar los sólidos, en las aguas a tratar. Este tratamiento engloba tres etapas primordiales para un tratamiento primario, los cuales son, cribado (es un proceso físico, en el cual se separa sólidos en su mayoría grandes, por medio de un tamizado), sedimentación (en esta etapa el agua y pequeños sólidos se separan por peso), floculación (este proceso tiene como finalidad retirar las grasas, aceites y sólidos de baja densidad) ³⁵.

Los tratamientos secundarios se fundamentan en la utilización de uno o varios procesos biológicos que se encargan de degradar la materia orgánica o contenido biológico como residuos biológicos humanos, residuos de alimentos, detergentes, entre otros³⁶.

Los procesos aerobios, como su nombre lo indica, emplean microorganismos aerobios, su objetivo es incrementar el contenido de oxígeno en las aguas, por medio de riegos de superficies sólidas, agitación y aireación sumergida. Aquí, las sustancias biodegradables disueltas funcionan como alimento para los microorganismos transformándolas en biomasa, dióxido de carbono y agua.³⁶

Los procesos anaerobios se consideran fermentativos, ya que se caracterizan por convertir la materia orgánica procesada en compuestos de metano y dióxido de carbono, con la ayuda de bacterias que se encargan de la degradación de los sólidos que llegan a esta etapa³⁷.

El proceso de lodos activados consiste en el desarrollo de un cultivo bacteriano contenido en las aguas residuales, se encuentran suspendidos y reciben oxígeno por el efecto del proceso de aireación, lo que genera una agrupación en flóculos, a lo que llamamos lodo activo³⁵.

El tratamiento terciario de aguas residuales, tiene la intención de mejorar la calidad del agua a partir de procesos físicos y químicos que garantizan un óptimo mejoramiento en las aguas efluentes. Dentro de estos encontramos la desinfección/esterilización por ultravioleta y la cloración³⁵.

Otros procesos que podemos encontrar dentro del tratamiento terciario es la oxidación avanzada, los cuales están basados en la generación de especies reactivas de oxígeno, su alta reactividad y un ataque poco selectivo, la hace capaz de degradar un gran grupo de contaminantes. Los principales sistemas de reacción para estos procesos de oxidación avanzada, emplean ozono, peróxido de hidrógeno, catalizadores metálicos, radiación ultravioleta y en algunos casos una combinación entre algunos de estos³⁴. Cabe señalar que, para fines de eliminación de contaminantes emergentes, el más utilizado es la ozonización. Este, tiene un potencial de oxidación elevado, por lo que se prefiere su uso para desinfectar agua potable, de tal forma que se espera una escasa formación de productos de desinfección y mayor biodegradabilidad. Entre los contras que suele tener este proceso de oxidación, encontramos el elevado costo del equipo, su mantenimiento y el costo energético necesario para el proceso³⁴.

Otro ejemplo de oxidación avanzada es la radiación ultravioleta, empleada para la oxidación de contaminantes emergentes, sin embargo, no se han encontrado resultados altos de eficiencia en cuanto a eliminación concierne, por lo que se prefiere su uso acoplado a otros procesos. Los procesos de fotocatálisis homogénea, Fenton ($\text{Fe}_3/\text{H}_2\text{O}_2$) y foto-Fenton ($\text{Fe}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$); y fotocatálisis heterogénea empleando dióxido de titanio ($\text{TiO}_2/\text{UV}/\text{O}_2$), ofrecen una alta

eliminación de contaminantes a una baja toxicidad y alta estabilidad, además del bajo costo puesto que en su mayoría emplea la luz solar como fuente de radiación³⁸. Si bien por otro lado el problema para fotocátalisis homogénea, radica en que la eficiencia se ve fuertemente influenciada por el pH, y en cuanto fotocátalisis heterogénea, el dióxido de titanio es difícil de separar de la matriz acuosa, por lo que se encarece el proceso ³⁹.

En cuanto a los métodos de tratamiento biológico, estos, dependen de la capacidad de los organismos para degradar los contaminantes orgánicos a productos inocuos como dióxido de carbono, agua y biomasa. Los métodos de tratamiento biológico dependen de la capacidad de los microorganismos para degradar residuos a productos inocuos (dióxido de carbono, agua y biomasa) a través de reacciones bioquímicas ⁴⁰. Sin embargo, existen algunas limitantes que dificultan su aplicación, como lo es el origen del vertido. Es por eso que surge la necesidad de emplear otro tipo de métodos para el tratamiento, ya que en ocasiones el efluente contiene sustancias que ponen en riesgo la viabilidad de las bacterias y/o modifiquen la estructura bioquímica de estas, las cuales son utilizadas principalmente en los tratamientos secundarios.

En este caso la mejor opción para suplir los métodos de tratamiento biológico con bacterias, es un método enzimático, dentro de los cuales se busca el uso de una porción de biomoléculas liberadas al medio por distintos microorganismos y plantas.

2.1.5 Tratamientos con hongos basidiomicetos

Un grupo de microorganismos, son los hongos del género *basidiomicetos*, particularmente aquellos conocidos como de pudrición blanca, los cuales de manera natural atacan los componentes de la pared celular de la madera húmeda, la cual está compuesta por un biopolímero aromático llamado lignina siendo estos los más efectivos para degradar lignocelulosa, ya que es una molécula extremadamente resistente al ataque microbiano.

Los hongos de pudrición blanca tienen la característica de producir diferentes tipos de enzimas cuyos sustratos naturales, como la lignina, que son igual de recalcitrantes como los contaminantes emergentes. *Trametes versicolor* es uno de los más estudiados desde mediados del siglo pasado⁴¹, esto puesto que ha demostrado tener la facilidad de producir distintos tipos de enzimas con alta actividad enzimática, las cuales tienen un amplio campo de aplicación biotecnológico desde el tratamiento de sitios contaminados como efluentes o suelos, hasta el campo industrial pasando por la medicina.

2.1.6 Enzimas

La degradación enzimática consiste en adicionar enzimas aptas para un sustrato, a un medio contaminado; con el fin de fragmentar o disminuir el analito de interés.

Dichas enzimas tendrán la facultad de oxidar distintos contaminantes orgánicos para transformarlos a otros productos permitiendo un mejor tratamiento final de los residuos. Algunas otras enzimas logran mineralizar los contaminantes y de esta manera son menos dañinos o incluso no perjudiciales a la salud ⁴².

Esta es una de las muchas aplicaciones en las que se han reportado el uso de las enzimas producidas por *Trametes versicolor*. En general las biomoléculas de mayor importancia de manera natural producidas por este hongo son tres, lacasas (Lac), lignina peroxidasas (LiP) y manganeso peroxidasas (MnP) ⁴³.

2.1.7 Lacasas

Las lacasas son enzimas glicoproteínas dimericas o tetramericas, que por lo general contienen de dos a cuatro átomos de cobre por monómero distribuido en tres sitios redox ⁴⁴. Caracterizada como oxidorreductasa, capaz de catalizar la oxidación de varios compuestos aromáticos, diaminas y aminas aromáticas, entre otros, siendo oxidados por la transferencia de un electrón, usando el oxígeno molecular como el aceptor del electrón, dicha reacción es acompañada por la consecuente reducción del oxígeno a agua ⁴⁵. Dichas enzimas se encuentran en diversos organismos como lo son bacterias, hongos y plantas, cabe señalar que la función de estas enzimas varía según su procedencia. Aunque las mayormente descritas e identificadas provienen de *basidiomicetos* como *Trametes versicolor*, entre otros ⁴⁶.

Al hablar de métodos enzimáticos, nos referimos a un tipo de tratamiento biológico, a su vez dentro de dichos métodos podemos encontrar dos variantes; aquellos en los que se puede emplear una o más tipos de enzimas libres en solución, y aquellas, cuyo método requiere anclar o inmovilizar las enzimas a un soporte.

Los tratamientos con enzimas libres, como se expresa, únicamente requieren de la selección de uno o más tipos de enzimas que catalicen los contaminantes deseados, una vez con los conocimientos previos obtenidos en tratamientos enzimáticos, solo queda dar paso a la reacción de degradación en la cual se lleva a contacto el efluente y las enzimas, según sean las mejores condiciones para lograr lo esperado⁴⁷. Algunas de las ventajas que se pueden encontrar en este tipo de método, es que se generan una mínima cantidad de subproductos tóxicos en comparación con los procesos químicos, poseen alta especificidad y gran capacidad catalítica y no es necesario trabajar a condiciones extremas para cumplir el objetivo, ya que involucra condiciones suaves(temperatura, presión y pH)⁴⁸.

Cabe señalar que existen algunas desventajas al trabajar con enzimas libres, pues, una vez que estas son aisladas de su medio natural, en su mayoría, tienden a perder actividad catalítica ya que se vuelven inestables, esto puesto que, pueden existir en el proceso sustancias que actúen como inhibidores, sin dejar de lado que una vez que se llegue a la recta final de la degradación, no podrán ser recuperadas para su reutilización [34] [35]

2.1.8 Tipos de inmovilización

Lo anterior nos lleva a la segunda variante, la inmovilización de enzimas para el tratamiento biológico de efluentes. Debido a que la obtención de un gran número de enzimas suele tener un costo elevado, además de evitar pérdidas del material enzimático, se pensó en la inmovilización, la cual pretende dar a las enzimas una vida más larga en cuanto a su uso se refiere, esto para combatir la baja estabilidad que presentan las enzimas al ser aisladas de su medio y su fácil desnaturalización por agentes químicos o biológicos.

La cual consiste en fijar o atrapar las enzimas en un material insoluble (gel, membrana, perlas de vidrio, etc.) de forma que no pierda la actividad catalítica y permita su recuperación, en una fase fácilmente separable del medio de reacción.

48

2.1.8.1 Inmovilización covalente

La inmovilización puede realizarse por diversos métodos, como lo son los métodos físicos, en los cuales encontramos, el confinamiento de la enzima en una membrana, la adsorción, ya sea física o iónica en una matriz insoluble, la inclusión, que se refiere al atrapamiento en un gel y la microencapsulación. Por otro lado, los métodos químicos, engloban, la formación de enlaces covalentes entre la enzima y una matriz activada, y el entrecruzamiento con agentes de bajo peso molecular.

En realidad, no es posible elegir un solo método para todas las enzimas, la elección de cada uno dependerá de la enzima a inmovilizar, sus características, así como el propósito para el cual se inmovilizará. Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas y desventajas; por ejemplo, la adsorción es simple, económica y efectiva, pero frecuentemente reversible; la inmovilización covalente y el entrecruzamiento es efectivo y durable, pero resulta costoso, y en algunas ocasiones afecta el desempeño de la enzima; y en el confinamiento en membranas, atrapamiento, y microencapsulación se han observado problemas de difusión

Algunas de las ventajas que se obtienen tras la inmovilización es mantener la estabilidad de la enzima a cambios de pH, temperatura y mantiene la estabilidad de la estructura.

2.2 Antecedentes

En 2011 Prieto y col., catalizaron la degradación de norfloxacin y ciprofloxacina con lacasas purificadas (>20 U/mg) en medio líquido. Con porcentajes de degradación $> 98\%$ (10 mgL^{-1} de cada uno) en 30 horas. Se realizó la identificación de los subproductos de transformación a lo largo del tiempo, por cromatografía líquida con espectrómetro de masas.⁵⁰

En 2014 Chang y col., inmovilizaron peroxidasas de rábano, partiendo de un núcleo de magnetita recubierto con sílice, a la cual se unieron partículas modificadas de NH_2 y glutaraldehído como agente de reticulación. Logrando así una retención de la enzima del 85% al soporte. Demostraron que bajo condiciones de pH 6.4 y 30°C , el modelo de inmovilización logro degradar el 80% del 2,4-dichlorophenol (0.2 mM L^{-1}) en 180 minutos.⁵¹

En 2014 Rauhl y col., realizaron la remoción de ciprofloxacino catalizada por lacasa y asistida por ultrasonido, lo cual reflejo la reducción del tiempo de degradación y un aumento en el porcentaje degradado. En el cual el 51% de ciprofloxacino fue removido en 5 horas con una carga de enzima del 0.02% (p/v), temperatura de 60°C , una potencia de 75 W, frecuencia de 22 kHz y agitación de 200 rpm.⁵²

En 2015, Ding y col., evaluaron la degradación de 14 tipos de Sulfonamidas, Tetraciclinas y Quinolonas, mediante la adsorción por suelo (centrándose principalmente en los comportamientos de transformación ambiental), la crearon un sistema de oxidación con lacasas y un sistema acoplado de suelo asistido con lacasa. Las sulfonamidas, se eliminaron principalmente por oxidación de lacasas libres, las quinolonas por adsorción de suelo. Los antibióticos de tetraciclina, se eliminaron con ambos tratamientos en el sistema acoplado, pero la oxidación de lacasas libre predominó. Las tasas de eliminación de cada antibiótico excedieron el 70% (10 mgL^{-1}) en 15 minutos y estuvieron cerca del 100% en 180 min.¹⁰

En 2017, Taheran y col., degradaron un grupo de fármacos en aguas residuales por medio de una inmovilización covalente de lacasas, en una membrana de nanofibras con una carga de enzimas de 12 U/g. Se logró degradar el 72.7% de diclofenaco, 63.3% de clorotetraciclina y 48.6% de carbadiacepina, después de 8 h de reacción, la concentración inicial de cada fármaco fue de 200 ppb.⁵³

2.3 Análisis crítico

Se ha evaluado la degradación biológica de ciprofloxacino, alcanzando el 90% a los 7 días de fermentación, con un *Trametes versicolor*. Además, se ha buscado degradar este contaminante con una bacteria termófila alcanzando una degradación máxima del 57 %, en soluciones de 5 mg L⁻¹, en un lapso de 120 horas. Sin embargo, cuando se utiliza el contaminante durante el crecimiento microbiano, no es posible separar los efectos de la degradación vía enzimática, de la remoción por biosorción y/o bio-acumulación. Por lo tanto, nos genera un residuo de biomasa contaminada ciprofloxacino, el cual se tendrá que disponer, además de generar costos extras al tratamiento.

También, se ha degradado ciprofloxacino con lacasas asistidas por ultrasonido, alcanzando una degradación del 50 %, sin embargo, este método puede dañar la integridad de la enzima, además, no se puede reutilizar y también agrega costos al proceso de degradación.

Se ha logrado inmovilizar peroxidadas de rábano y lacasas, con porcentajes de retención de la actividad por arriba del 80 % en sistema de SiO₂ con magnetita y en nanofibras, respectivamente, lo que permite su reutilización en varios ciclos.

Diversas investigaciones han demostrado que las lacasas libre e inmovilizadas, son capaces de degradar una gran variedad de fármacos. Sin embargo, no se degradado ciprofloxacino con lacasas inmovilizadas, ni tampoco se ha reportado la inmovilización de lacasas en nanoestructuras tipo *core shell* de Fe₃O₄@SiO₂.

2.4. Aportación Científica

Degradación del ciprofloxacino en más del 90% en solución, con enzimas lacasas obtenidas y purificadas de un *Trametes versicolor* nativo de la región. Además, la inmovilización de lacasas en nanoestructuras tipo *core shell* de Fe₃O₄@SiO₂, que permitan la reutilización en varios ciclos y que pueda ser escalable a nivel industrial.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Las lacasas inmovilizadas de *Trametes versicolor*, en nanoestructuras tipo *core shell* de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$, degrada más del 90% de ciprofloxacino en solución.

3.2 Objetivos y Metas

3.2.1 Objetivo General

Inmovilizar lacasas de *Trametes versicolor*, en nanoestructuras tipo *core shell* de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ para la degradación de ciprofloxacino.

3.2.2 Objetivos específicos

1. Producir y purificar lacasas de *Trametes versicolor* en cultivo sumergido.
2. Sintetizar, funcionalizar y caracterizar nanoestructuras tipo *core shell* de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$.
3. Inmovilizar lacasas en las nanoestructuras *core shell* sintetizadas.
4. Realizar las pruebas de degradación de ciprofloxacino con lacasas inmovilizadas en nanoestructuras tipo *core shell* de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$.

3.2.3 Metas de Investigación

- Inmovilización de enzimas en un soporte nanoestructurado tipo *core shell* químicamente modificado.
- Desarrollo de una alternativa verde y sustentable para la remoción de ciprofloxacino en aguas residuales.

3.2.4 Metas Académicas

- Obtención de una tesis de maestría en un periodo no mayor a 2.5 años.
- Presentación de resultados en un congreso nacional o internacional.
- Publicación de un artículo científico en revistas científicas indexadas.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación de equipo y material

Todos los equipos que se utilizaron durante el desarrollo de este proyecto de investigación se encuentran disponibles en la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, tales como: balanzas analíticas, campanas de flujo laminar, incubadoras, muflas, material de laboratorio básico, espectrofotómetro UV-visible, SEM, Zetasizer NANO ZSP, FTIR-ATR, y el HPLC etc.

El equipo de caracterización por XPS, se usó en colaboración con el Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales, del CINVESTAV unidad Mérida. Además, la micrografía de TEM, se realizó en la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas de la UANL.

4.2 Metodología

4.2.1 Propagación de la cepa fúngica de *Trametes versicolor*

La propagación de la cepa fúngica se realizó en caja petri con agar extracto de malta, el cual está compuesto por 12.75 g de maltosa, 2.75 g de dextrina, 2.35 g de glicerol, 0.78 g de peptona y 15.0 g/L de agar, con un pH final de 4.7. Se esterilizó en una autoclave a 121° C, 15 psi por 15 minutos. Posteriormente a su solidificación se inoculó un fragmento de micelio del hongo en el centro de las placas, de 1 cm² aproximadamente. Se incubó a 30° C por 12 días, revisando las placas cada 24 h para corroborar el crecimiento. Una vez cumplidos los 12 días, se almacenaron a 4° C⁵⁰.

4.2.2 Producción de lacasas por fermentación sumergida

La producción de las enzimas se llevó a cabo por medio de fermentación sumergida, el medio líquido de cultivo estuvo compuesto por: glucosa (5 g/L), KH₂PO₄ (0.2 g/L), MgSO₄ · 7H₂O (0.05 g/L), CaCl₂ (0.01 g/L), 10 ml de solución de elementos traza. De

igual manera el medio fue enriquecido con salvado de trigo como cosustrato a 6 g/L y 1 mM de CuSO_4 como cofactor. Se inocularon 10 plugs en un biorreactor de un volumen de 250 mL donde se llevó a cabo la fermentación, bajo las condiciones específicas de 30°C a 150 rpm por 9 días. Se tomaron muestras de 1 mL cada 48 horas y los últimos 4 días cada 24 h, para de cada uno de los biorreactores, con la finalidad monitorear el comportamiento de la actividad enzimática, la proteína extracelular, los azúcares reductores y los compuestos fenólicos.⁵⁰

4.2.3 Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática se realizó a cada una de las muestras de los bioreactores, mediante un sistema de reacción de 1 mL, el cual consistió de 700 μL de agua desionizada, 100 μL de extracto enzimático, 100 μL de buffer de acetatos (1 M, pH 5) y 100 μL de ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS 5 mM). Una vez añadido el ABTS, se midieron los incrementos de absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 420 nm, previo a esto se calentaba la muestra a 40° C durante 1 min, para después realizar la lectura.⁵⁴ Una unidad de actividad, está definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de ABTS ($\epsilon=3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.2.4 Cuantificación de proteína extracelular

Para determinar la concentración de proteína se construyó una curva de calibración con 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2500 $\mu\text{g/mL}$ de albumina sérico bovina como estándar. Se tomarán 100 μL de muestra con 1 mL de reactivo de Bradford, para ser incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron por espectroscopia UV-VIS a una longitud de onda de 595 nm.⁵⁵

4.2.5 Evaluación de azúcares reductores (método de Miller)

Se analizó una mezcla de reacción que consistía en 0.5 mL de extracto enzimático y 0.5 mL de reactivo de DNS (3,5-dinitrosalicilato), incubando a 98° C durante 5 min, para posteriormente incubar en agua fría para frenar la reacción, se adicionaron 5 mL de agua desionizada a cada una de las muestras, se mezclaron perfectamente con ayuda de un vórtex, para después dejar reposar por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se analizaron las muestras por espectroscopia UV-Vis a

una longitud de onda de 575 nm. La curva de calibración se determinó usando glucosa como estándar⁵⁶.

4.2.6 Determinación de compuestos fenólicos

Se analizaron 0.5 mL de la muestra de extracto enzimático, llevando a una reacción con 0.5 mL de reactivo de Folin Ciocalteu, dejando reposar durante 5 min. Una vez transcurrido el tiempo, se añadieron 1.5 mL de una solución de carbonato de sodio al 20%, llevando la mezcla a agitación profunda utilizando un vórtex. Posteriormente se dejó reposar durante 90 minutos, a temperatura ambiente. La reacción fue analizada por espectroscopia UV-VIS a una longitud de onda de 760 nm. La curva de calibración se realizó con ácido tánico como estándar⁵⁷.

4.2.7 Precipitación con sulfato de amonio

Con el extracto crudo enzimático se precipitaron las proteínas de alto peso molecular con una solución de sulfato de amonio, la cual se agregó lentamente al extracto crudo enzimático. Iniciando con una saturación del 20% hasta llegar al 50%, llevando a agitación lenta durante una hora a 4 °C, se separó esa fracción para ser analizada por oxidación de ABTS. Siguiendo con la precipitación se procedió a agregar una concentración de 60% de saturación hasta llegar a una saturación del 80%, de igual manera se dejó en agitación lenta durante una hora a 4 °C. Enseguida se dejó reposar la fracción enzimática durante 12 h. Transcurrido el tiempo de reposo, se centrifugo el extracto crudo a 4,500 rpm a 4 °C por 30 minutos, los sobrenadantes fueron decantados y los pellets resuspendidos en 2 mL de buffer de acetatos 0.1M a pH 5. Ambas fracciones fueron analizadas por oxidación de ABTS^{58 59}.

4.2.8 Ultrafiltración

Los extractos crudos enzimáticos fueron separados por ultrafiltración con unidades de centrifugación AMICON (30 kDa y 100 kDa) para concentrar el extracto crudo. La centrifugación se llevó a cabo a una velocidad de 4,500 rpm, a 4 °C y un tiempo de 30 min⁶⁰.

4.2.9 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

Los geles de electroforesis fueron realizados de acuerdo al método de Laemmli (1970), en todos los casos se utilizó una concentración del 13% de acrilamida. Para la preparación de las muestras en tubos eppendorf se mezclaron 10 µL de la

muestra con 3 μL del buffer de la muestra. Se colocaron en un baño a 100 °C por 10 minutos para su completa desnaturalización y se cargaron los pozos con 10 μL de la mezcla y el primer carril se cargó con un marcador de peso molecular (Bio-Rad Precision Plus Protein Standards). Los geles se corrieron en una cámara Bio-Rad a un voltaje constante de 180 volts en el buffer de corrida por un tiempo de una hora. Se revelaron las bandas de proteínas con una solución de azul de Coomassie.

4.2.10 Preparación de nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

Las nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 fueron obtenidas comercialmente en NanoAmor. Posteriormente, se pesaron y añadieron 100 mg nanopartículas de Fe_3O_4 a una mezcla de 150 mL etanol y 40 mL agua destilada, se llevaron a sonicación por 30 minutos. Transcurrido el tiempo se agregaron 3.0 mL de solución de hidróxido de amonio (30% en peso) y 0.6 mL de TEOS, dejando en agitación 8 horas, para finalmente lavar y se dejará secar⁶¹.

4.2.11 Modificación química de la superficie

Después de la obtención de la nanoestructura tipo *core shell* de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, se realizó la modificación a la superficie del material con APTES. Se dispusieron 0,5 g de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, añadiendo a 50 mL de solución de tolueno que contenga 1.5 mL de APTES, dejando en agitación a 60°C durante 20 h, la mezcla se sometió a lavados con tolueno y acetona. Fue denominada $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ⁶².

4.2.12 Caracterización de las nanoestructuras tipo Core Shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

Se llevo a cabo la caracterización de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ antes y después de la modificación química de la superficie, mediante difracción de rayos X, espectroscopia infrarroja por ATR, microscopia electrónica de barrido, dispersión dinámica de luz y potencial ζ . La difracción de rayos X (DRX) de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, se realizó en un difractómetro de rayos X con una fuente de radiación generada a 40 kV y 30 mA. La microscopía electrónica de barrido (SEM) con una aceleración de 15 kV; Microscopía electrónica de transmisión (TEM) con un Jeol-2010 Electron Microscope. La distribución del tamaño de partícula, se determinó mediante la dispersión dinámica de la luz y la carga superficial mediante potencial ζ , con un Zetasizer NANO ZSP, Malvern⁶³.

4.2.12.1 Difracción de Rayos X (DRX)

La Difracción de Rayos X se utilizó para determinar la correspondencia de las nanopartículas sintetizadas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ con el patrón de difracción del Fe_3O_4 puro. El análisis se realizó bajo temperatura ambiente, presión constante, con un voltaje de 35 kV y 25 mA y un ángulo de 5 a 90°. El equipo usado fue un Difractómetro de Rayos X marca Siemens y modelo D-5000.

4.2.12.2 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier con Reflexión Total Atenuada (FTIR-ATR)

Se usó espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier con Reflexión Total Atenuada para observar los enlaces entre el Fe-O correspondientes al Fe_3O_4 , Si-O correspondientes al SiO_2 , al igual que las nanopartículas funcionalización con los grupos amino por medio de la adición de enlaces N-H. lo anterior a temperatura ambiente, con un parámetro de número de onda fue de 400 a 2000 cm^{-1} . Se utilizó un equipo marca Perkin Elmer modelo Spectrum One,

4.2.12.3 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La caracterización mediante SEM se realizó con la finalidad de conocer la morfología de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. Además, se realizó un Sistema de Microanálisis de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS o EDX) para determinar los elementos contenidos en las nanopartículas. Las muestras se colocaron sobre una cinta adhesiva de carbono. Las condiciones del análisis fueron, ultravacío (10-5 Pa) en la cámara de observación, el voltaje usado fue de 3.0 kV y la magnificación fue desde 1000x hasta 30000x aumentos. El instrumento utilizado fue un Microscopio Electrónico de Barrido marca JEOL (modelo JSM-6701F).

4.2.12.4 Microscopia electrónica de Transmisión (TEM)

Para conocer la morfología de las nanopartículas, así como la visualización del *core* y del *shell* se utilizó la microscopia electrónica de transmisión (TEM) con un Jeol-2010 Electron Microscope, tensión de aceleración de 200 kV. El sistema de vacío se empleó en el rango de 10^{-9} Torr, con 25° de ángulo de inclinación máximo en etapas de inclinación simple y doble Capaz de campo brillante, imagen de campo oscuro y cámara CCD.

4.2.12.5 Potencial ζ

Se utilizó un equipo Zetasizer NANO ZSP marca Malvern y celdas capilares plegadas (DTS1070), a una temperatura de 25° C y potencia de 95 - 240 VCA +/- 10 %, 50-60 Hz.

4.2.13 Inmovilización

El buffer (pH 7) que contenía partículas magnéticas se mezcló con 1.6% de glutaraldehído a 25°C durante 3 h. A continuación, se realizaron lavados con la solución buffer y agua destilada. Las partículas fueron previamente tratadas con glutaraldehído (1.6 g) y lacasa (2 mg) se dispersaron en un buffer pH 8.0 dejando la mezcla en agitación de 150 rpm durante 11 h a 25°C. Las partículas se recuperaron por separación magnética, realizando lavados con buffer de fosfato y agua para eliminar los restos enzima unida no específicamente⁵¹.

4.2.14 Degradación de Ciprofloxacino

La solución de enzima inmovilizada se mezclará con una solución de Ciprofloxacino a un pH 4.5. La mezcla se dispuso a agitación de 200 rpm a 40° C. Mediante intervalos de tiempo dados, se tomarán alícuotas de la muestra de 1 mL de la solución reacción. Una vez concluido el tiempo de degradación se recuperó el soporte por separación magnética, para realizar una siguiente cinética de degradación. La concentración restante de ciprofloxacino se determinó por técnica de cromatografía de líquida de alta resolución (HPLC)⁵¹.

4.2.15 Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los estándares y muestras ante la degradación de ciprofloxacino fueron evaluadas mediante cromatografía líquida de alta resolución en una fase (A) de agua con 2.5% ácido fórmico y una fase (B) de metanol con 2.5 % de ácido fórmico. Un flujo de 150 μ L/min. Un gradiente lineal de 0.01 min, 70% (A); 5 min, 35% (A); 15 min, 70%(A).

4.3 Disposición de los residuos generados.

Los residuos generados en el presente trabajo, serán dispuestos de acuerdo a lo establecido en el reglamento de la Facultad de Ciencias Químicas, de la UANL.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Propagación de la cepa fúngica

La propagación de la cepa fúngica se llevó a cabo con éxito en agar extracto de malta. el crecimiento del hongo finalizo al día 12 de incubación, iniciando con la aparición de áreas de micelio hialino que según transcurrían los días se presentaba un crecimiento acelerado. En la Figura 1, se presenta el micelio en dos puntos distintos del periodo de incubación, se puede apreciar su coloración blanca con una apariencia algodonosa.



Figura 1. Propagación de *Trametes versicolor* en placa Petri con agar extracto de malta.

5.2 Producción de lacasas por fermentación sumergida

La producción de las enzimas, dispuestas en el metabolismo secundario⁶⁴ de *Trametes versicolor*, se llevó a cabo mediante fermentación sumergida en medio mineral enriquecido con salvado de trigo como cosustrato y sulfato de cobre como cofactor.

El día de máxima producción de enzimas lacasas se reporta al día 9.

En la Figura 2 se aprecia la relación entre los azúcares reductores y la actividad enzimática de lacasa, ambas monitoreadas del día 0 al día 10, donde podemos observar una relación indirecta de ellas. Al disminuir en su mayoría la concentración de azúcares reductores (utilizados como fuente de carbono)⁶⁵ se observa un aumento significativo en la concentración de lacasa, lo que indica que la actividad se dispara una vez que se ha consumido el sustrato (glucosa), lo que indica que las enzimas se producen como respuesta a la necesidad de degradar el cosustrato⁶⁶.

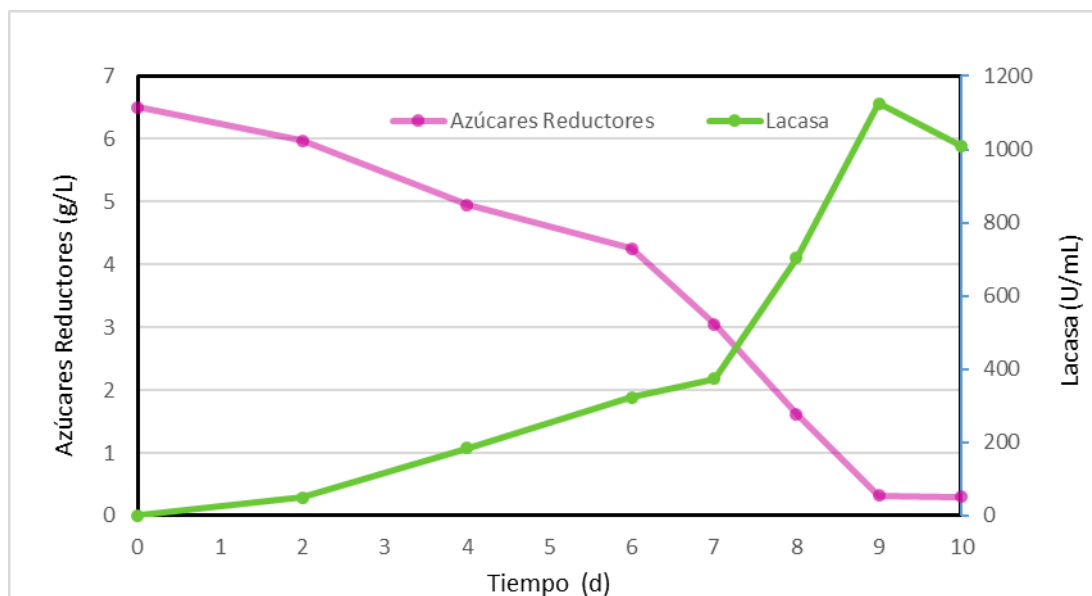


Figura 2. Relación entre la concentración de azúcares reductores y la actividad enzimática de lacasa en el medio.

Una manera directa de evaluar la liberación de lacasas al medio, es con la determinación de proteínas, puesto que a mayor concentración de proteínas mayor crecimiento.

En la Figura 3 podemos observar un aumento de proteínas a partir del día 5 con una concentración máxima en el día 7 con 68 $\mu\text{g/mL}$ de proteína, aunque la mayor liberación de lacasas se encuentra en el 9 con 1125 U/mL, y a este día observamos una menor concentración de proteínas correspondiente a 57 $\mu\text{g/mL}$. La explicación a esta variación la mencionan Bonnarne y Jeffries (1990), refiriéndose a que las lacasas no son las únicas enzimas producida por *Trametes versicolor* en el metabolismo secundario, sino que viene acompañada por dos tipos de enzimas más, las cuales tienen su producción máxima en el día 7⁶⁷, la cual empieza a cesar solo horas después.

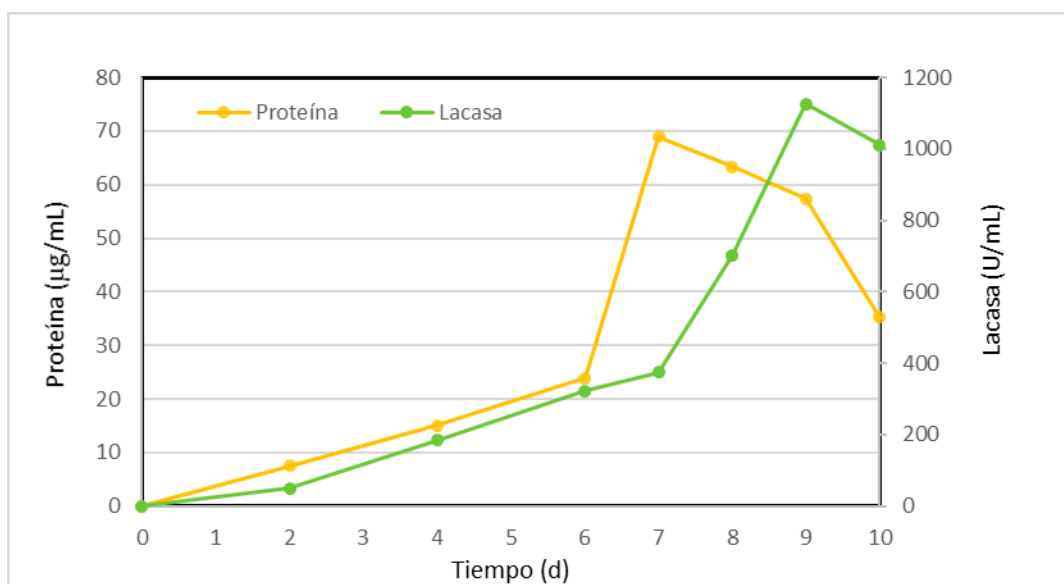


Figura 3. Relación entre la concentración de proteína extracelular y la actividad enzimática de lacasa en el medio.

La fermentación sumergida de *Trametes versicolor* en medio líquido, requiere de un cosustrato para inducir una mayor producción de enzimas, este cosustrato se suministra al inicio de la fermentación en forma de salvado de trigo, el cual, una vez hidrolizada la lignina presente en el salvado, da como resultado la hidrólisis de la lignina, liberando compuestos fenólicos, los cuales a su vez son aprovechados por el hongo como inductor para la producción de enzimas⁶⁸. A medida que se producen enzimas, se puede observar una mayor concentración de compuestos fenólicos, tal cual se observa en la Figura 4. La máxima liberación de lacasas está dada al tener bajas concentración de compuestos fenólicos puesto que funcionan como mediadores redox, ya que una concentración de fenoles es inhibitoria de los metabolitos secundarios. Según lo expuesto por Rio Campos y colaboradores en el 2014.

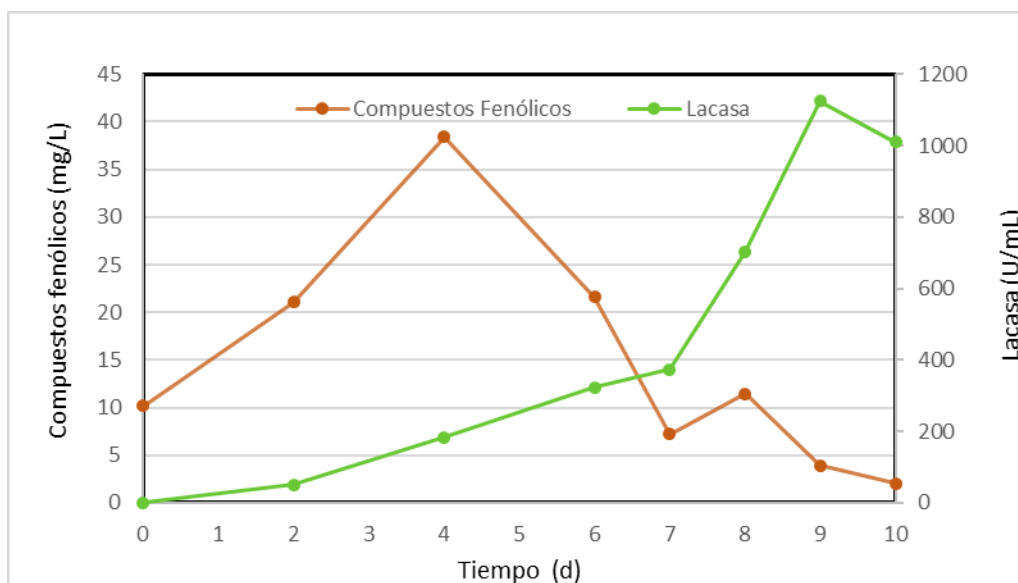


Figura 4. Relación entre la concentración de compuestos fenólicos y la actividad enzimática de lacasa en el medio.

5.3 Concentración de lacasas por precipitación con sales y ultrafiltración

Tras realizar la producción de lacasas por fermentación líquida, muestra a la cual se le denominó extracta crudo, se procedió a concentrar por ultrafiltración, se observó que la concentración actividad enzimática y proteína extracelular, se mantuvo igual. Mediante la precipitación de las proteínas con sales de sulfato de amonio, se logró elevar aproximadamente 4 veces la actividad enzimática inicial. Por último, para hacer más selectiva la concentración de lacasas, se realizó una ultrafiltración en la cual se utilizaron filtros con poros de 50 y 100 kDa, puesto que la enzima en cuestión tiene un peso molecular que oscila entre 55 y 65 kDa.

Tabla 2. Comparación entre actividades enzimáticas (U/mL), proteína extracelular (mg/mL) y actividad específica, en cada paso de la purificación

	Extracto crudo	Ultrafiltración (10 kDa)	Precipitación con sulfato de amonio	Ultrafiltración (50 kDa y 100 kDa)
Actividad enzimática	1,125 U/mL	1,125 U/mL	4,328 U/mL	26,160 U/mL
Proteína extracelular	57 U/mL	57 U/mL	193 U/mL	1185 U/mL
Actividad específica	19.73	19.73	22.42	22.07

5.4 SDS-PAGE

El proceso de purificación se visualizó posteriormente por medio de un SDS-PAGE, como se muestra en la Figura 5. En esta figura se compraron el extracto parcialmente purificado con una muestra de lacasas comerciales de Sigma Aldrich. Con este resultado se comprobó la purificación de enzimas lacasas, tras revelar el gel de electroforesis se logró observar dos bandas cercanas al marcado de peso molecular de 70 kDa y 50 kDa, para ambos casos de las muestras, lo que nos indica que la purificación parcial fue realizada con éxito. Estas dos bandas, corresponden al peso molecular de las lacasas, según lo reportado por Gutiérrez Soto⁶⁹.

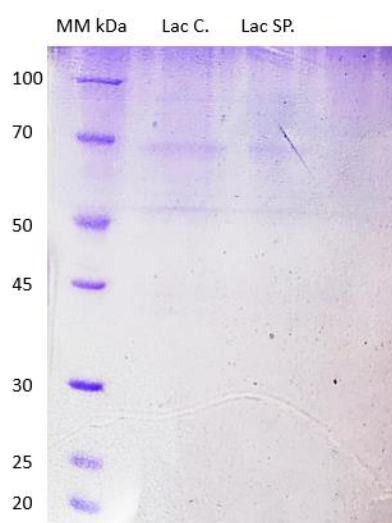


Figura 5. Gel de electroforesis revelando el peso molecular de Lacasa liofilizada comercial (Lac C.) y Lacasa semipurificada (Lac SP.)

5.5 Evaluación de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ como soporte para inmovilización de lacasas

5.5.1 Estabilidad del inmovilizado frente a diferente pH

Se realizó la evaluación de la estabilidad de las enzimas lacasas en ocho diferentes pH, a una temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo y realizada la determinación de actividad enzimática, se comprobó que esta, se mantenía en un porcentaje de actividad mayor a pH de 4.5 y 7, y un porcentaje menor a pH de 3.5 y 6. Cabe señalar que el límite inferior, no sobrepaso el 85% de actividad enzimática final, ver Figura 6.

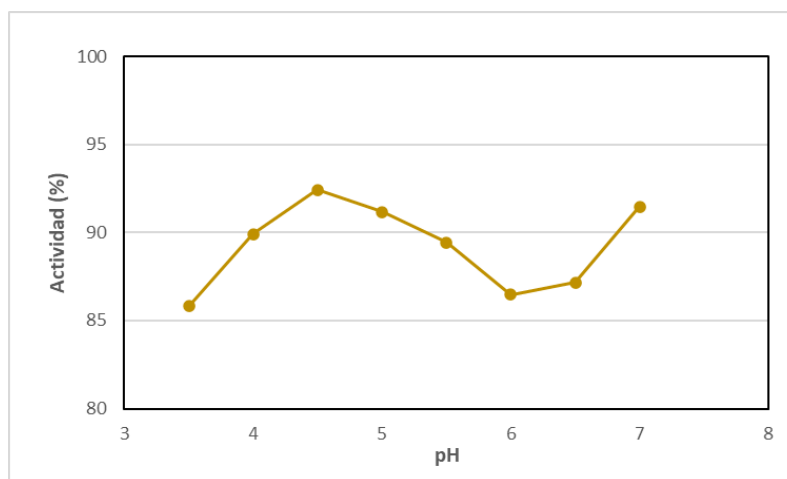


Figura 6. Evaluación de la actividad enzimática de lacasas inmovilizadas en distintos pH.

5.5.2 Estabilidad en distintas temperaturas

Una vez que se comprobó el mejor pH para mantener la mayor actividad enzimática. Partiendo de los resultados anteriores, se realizó una nueva inmovilización de lacasas para evaluar el porcentaje de actividad enzimática a diferentes temperaturas durante un periodo de 2 horas. Como se puede observar en la Figura 7, se mantuvo la actividad enzimática de 99.88% – 99.69%, dentro de 10, 20 y 25° C. Reportando un descenso en la actividad enzimática (92.36% - 90.53%) para las temperaturas entre 50 y 60° C.

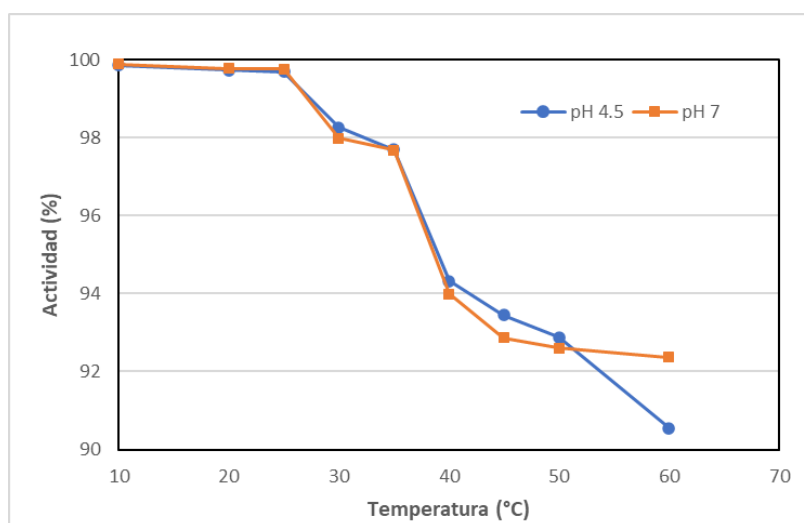


Figura 7. Evaluación de la actividad enzimática de lacasas a pH 4.5 y pH 7 a diferentes temperaturas.

En el caso de los dos distintos pH, estos, se comportaron muy similares para la mayoría de las temperaturas, solo en la muestra a 60° C, se pudo observar un descenso en la actividad en la muestra a pH 4.5 contra la de pH 7.

5.6 Síntesis, funcionalización y caracterización de nanoestructuras tipo *core shell* de Fe_3O_4 @ SiO_2 - NH_2

5.6.1 SEM

Mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido, se logró determinar el tamaño promedio de las nanopartículas de magnetita comercial (Fe_3O_4), oscilando en los 63.3 nm, con una desviación estándar de 5.11 nm, como se observa en a Figura 8. Partiendo de la premisa de que las nanopartículas de Fe_3O_4 que se utilizaron en este proyecto son comerciales y tienen un diámetro promedio de 50 nm, podemos comparar la síntesis del *core shell* con la reportada por Chang y Tang en 2014, cuyo *core* de Fe_3O_4 fue sintetizado, con un diámetro promedio de 15 nm y un *shell* de SiO_2 de 195 nm, podemos concluir que nuestra nanopartícula pudo tener un espesor mayor de SiO_2 si se hubiese elevado la concentración del precursor de este mismo (APTES), tal como lo indico Salgueiriño y col. en 2006.

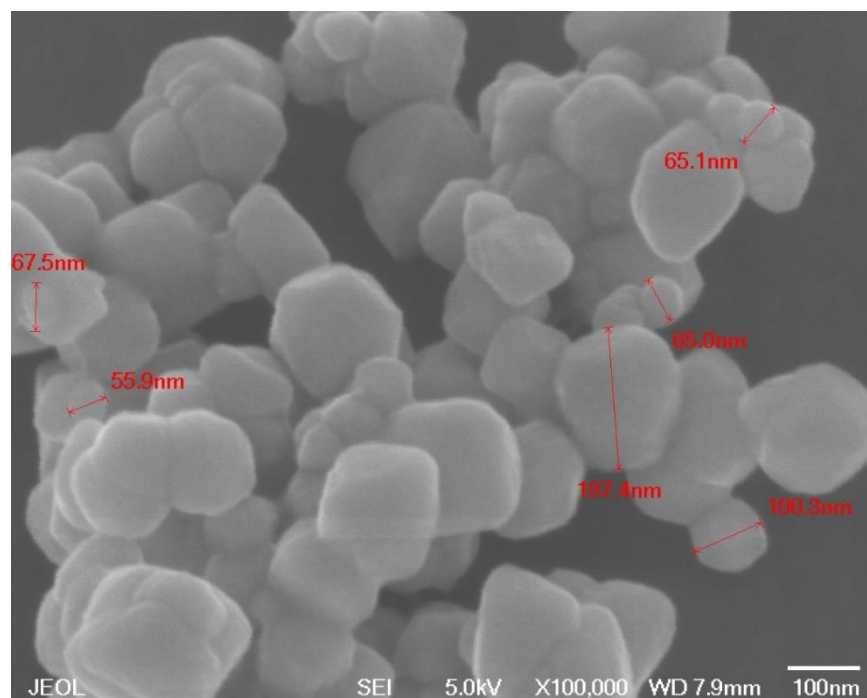


Figura 8. Micrografía electrónica de barrido de Fe_3O_4

Seguido de la síntesis del *shell* de SiO_2 se realizó un segundo análisis por SEM esperando encontrar un aumento en el diámetro de las nanopartículas, lo cual

indicaría una correcta adhesión del dióxido de silicio al core de Fe_3O_4 . Lo anterior fue comprobado tras analizar el promedio del tamaño en dicha micrografía, el cual se encuentra en 125.8 nm con una desviación estándar de 3.6 nm, como se observa en la Figura 9. Siguiendo con el análisis entre Chan y Tang (2014) con este proyecto, ellos, reportan una nanopartícula con promedio final equivalente a 210 nm de diámetro, muy cercano al doble del diámetro de la sintetizada en esta investigación, lo cual es un poco desfavorable para el alcance del presente trabajo, debido a que al existir una mayor superficie sería considerable la capacidad de inmovilización de enzimas ante el material.

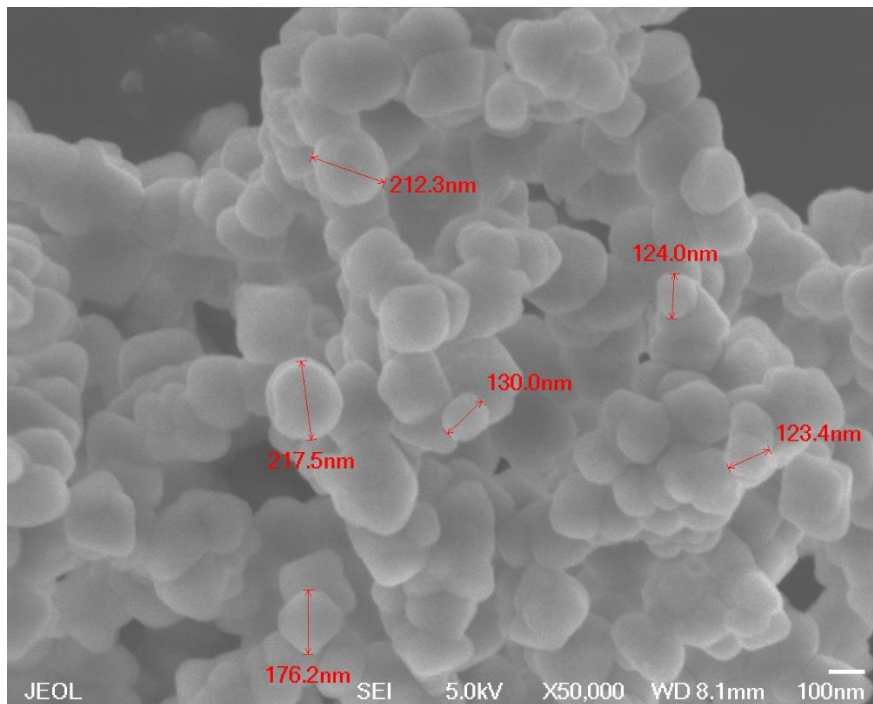


Figura 9. Micrografía electrónica de barrido del *core shell* de Fe_3O_4 @ SiO_2

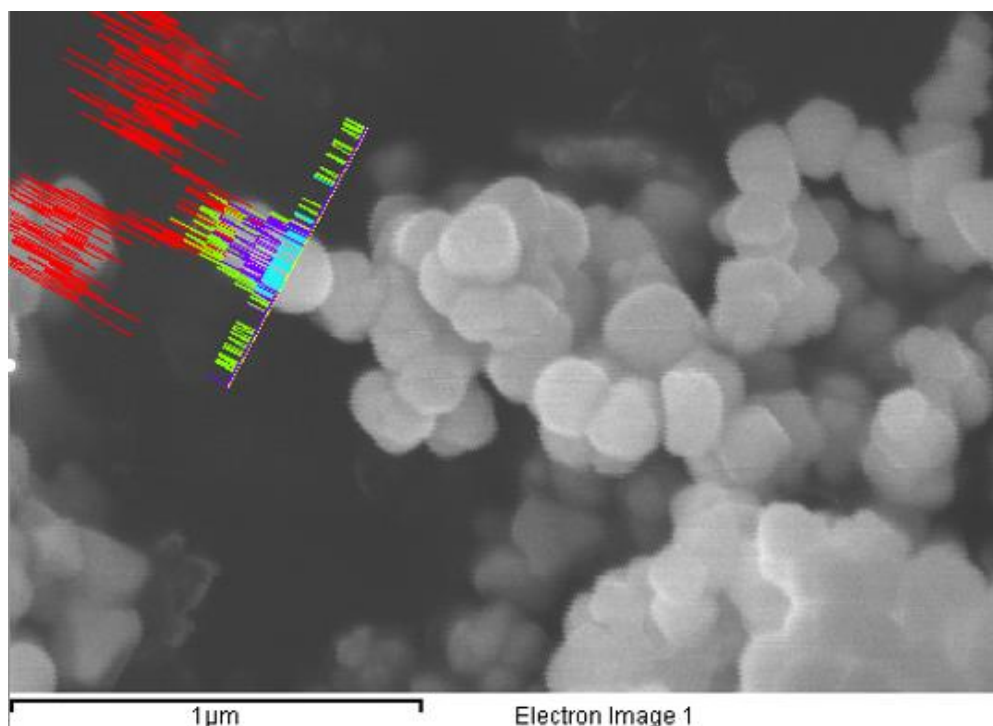


Figura 10. Micrografía electrónica de barrido con espectro elemental de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$

Mediante una estimación cuantitativa, obtenida de EDS, se puede apreciar el porcentaje de peso y atómicos de cada uno de los elementos presentes en las nanopartículas (Tabla 3). A pesar de la obtención de partículas asimétricas sin morfología completamente definida y la formación de aglomerados, como se observar en la Figura 10, el análisis elemental indica la presencia de estos tres elementos (Fe, O, Si).

Tabla 3. Porcentajes de elementos presentes en la muestra.

Elemento	% Peso	% Átomos
Oxígeno	47.09	74.54
Silicio	3.29	2.96
Hierro	49.62	22.5
Total	100.00	100.00

5.6.2 TEM

Tras el análisis de microscopía electrónica de transmisión, se obtuvo una micrografía de TEM, detallada de la morfología de las nanopartículas, la homogeneidad y la formación del recubrimiento de dióxido de silicio en la superficie de estas, ver Figura 12. Se estudió la distribución de tamaños de la nanopartícula, cuyo tamaño promedio oscila entre 57 nm para el *core* de Fe_3O_4 y 113 nm para el *core shell* completo, de los cuales 28 nm son los correspondientes al espesor de SiO_2 .

En la Figura 12, se puede apreciar, en escala de grises las dos partes que forman las nanopartículas, el *core* en gris oscuro (Fe_3O_4) y el *shell* en gris claro, del SiO_2 , que recubre a la magnetita.

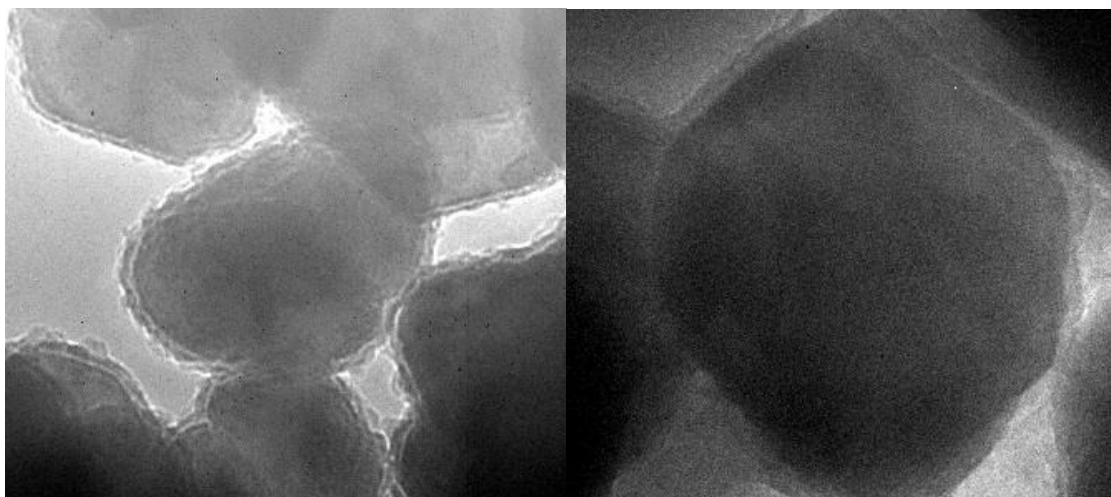


Figura 11. Micrografía electrónica de transmisión del core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2$.

5.6.3 DRX

Se realizó un análisis por difracción de rayos X, esto, una vez que se sintetizó el *shell* de SiO_2 , el cual llamaremos $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2$. El difractograma de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2$ fue comparado con el patrón de difracción de Fe_3O_4 en el cual los planos característicos y correspondientes al patrón de difracción se encuentran presentes en 32° (220), 35° (311), 34° (400), 54° (422), 57° (511) y 63° (440). En la Figura 13, observamos que de acuerdo con posiciones de los picos de reflexión e intensidades relativas, se observa que ambas muestras exhiben estructuras idénticas, indicando que la modificación con el SiO_2 no induce un cambio en la estructura cristalina de las nanopartículas de Fe_3O_4 . Según autores como Yufang Zhu *et al.* y Rodríguez López *et al.*, la posición de los picos respecto a los grados

2Theta, comparado con la caracterización de nanopartículas de magnetita y dióxido de silicio, son correspondientes al patrón de difracción de la primera, importar el método de síntesis de magnetita^{70 62}.

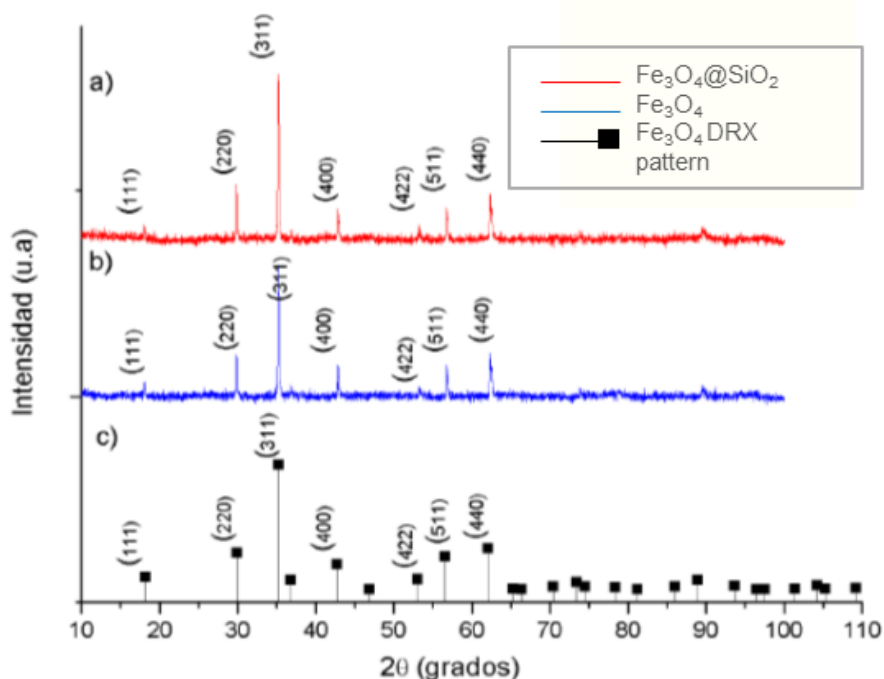


Figura 12. Difractograma de Fe_3O_4 con $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2$

5.6.4 Espectroscopia por infrarrojo FTIR-ATR

En la Figura 14, se observa el patrón por FTIR-ATR de distintas nanopartículas, primero están en negro las nanopartículas comerciales de Fe_3O_4 , obteniendo una banda de vibración característica de la unión de Fe-O alrededor de 546 cm^{-1} . Como parte de la síntesis del *shell* de SiO_2 , en un segundo análisis (línea roja), se logró corroborar la presencia de tres bandas de vibración correspondientes a la unión Si-O, localizadas en $1,060\text{ cm}^{-1}$, 955 cm^{-1} y 435 cm^{-1} . Siguiendo la síntesis de las nanopartículas funcionalizadas, se analizó una muestra de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, la cual seguía conservando las bandas encontradas con anterioridad, correspondientes a las uniones de Fe-O y Si-O. Sin embargo, hay unas pequeñas

perturbaciones en $1,467\text{ cm}^{-1}$ y $1,436\text{ cm}^{-1}$, pero son demasiado pequeñas y no es concluyente para encontrar una banda correspondiente a la presencia de NH_2 . Esto es de esperarse, debido a que el material es oscuro, por lo que se cree que la nanopartícula actúa como cuerpo negro⁷¹, absorbe la radiación que incide sobre NH_2 evitando así la aparición de la banda correspondiente a esta. Por esta razón, se analizaron estas partículas por XPS y por potencial ζ .

Los espectros obtenidos mediante esta técnica son similares a los reportados por otros autores para nanopartículas de magnetita comercial y un poco distintos a los reportados para magnetita obtenida por síntesis de co-precipitación; en referencia al shell o coraza de SiO_2 , la correspondencia de los espectros de otros autores mediante el mismo método son completamente similares, lo que sugiriendo que el método de recubrimiento fue efectivo y que la sílice se encuentra unida a las partículas de magnetita⁷².

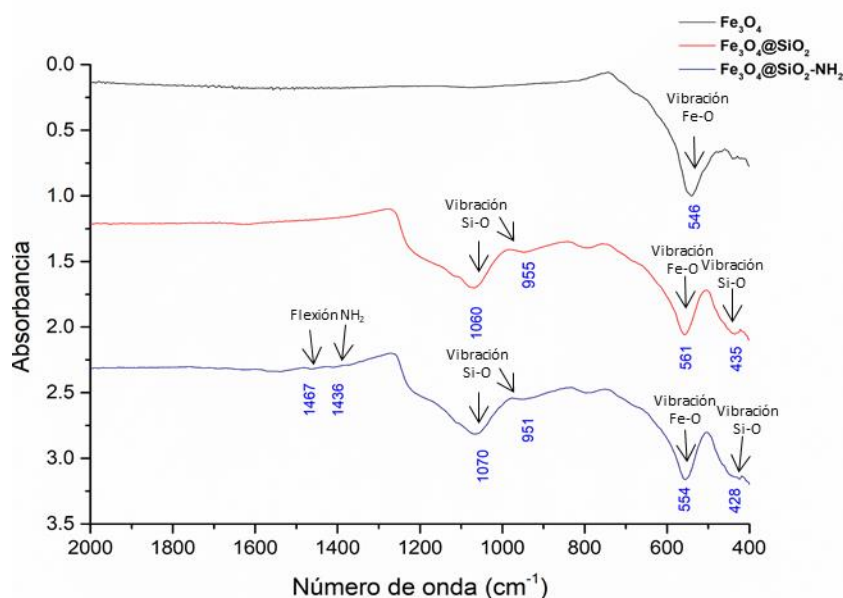


Figura 13. Espectro de FT-IR de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2$ en distintos puntos de la síntesis.

5.6.5 XPS

Tras no lograr identificar con relevancia la presencia del grupo amino mediante FTIR-ATR, se realizó un análisis por XPS-Survey.

En la Figura 15, observamos que se logró identificar la presencia de cada uno de los elementos esperados en la síntesis, en la partícula de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$. Se observó la presencia de Fe, con una energía de enlace en 710 eV, otra en 103.6 eV

para Silicio, oxígeno en 533.2 eV y en 400 eV perteneciente a nitrógeno, este último, indica la obtención de la funcionalización con grupos NH_2 mediante el precursor APTES, así como un pico al alrededor de 300 eV indicando carbono de los grupos etoxi del APTES.

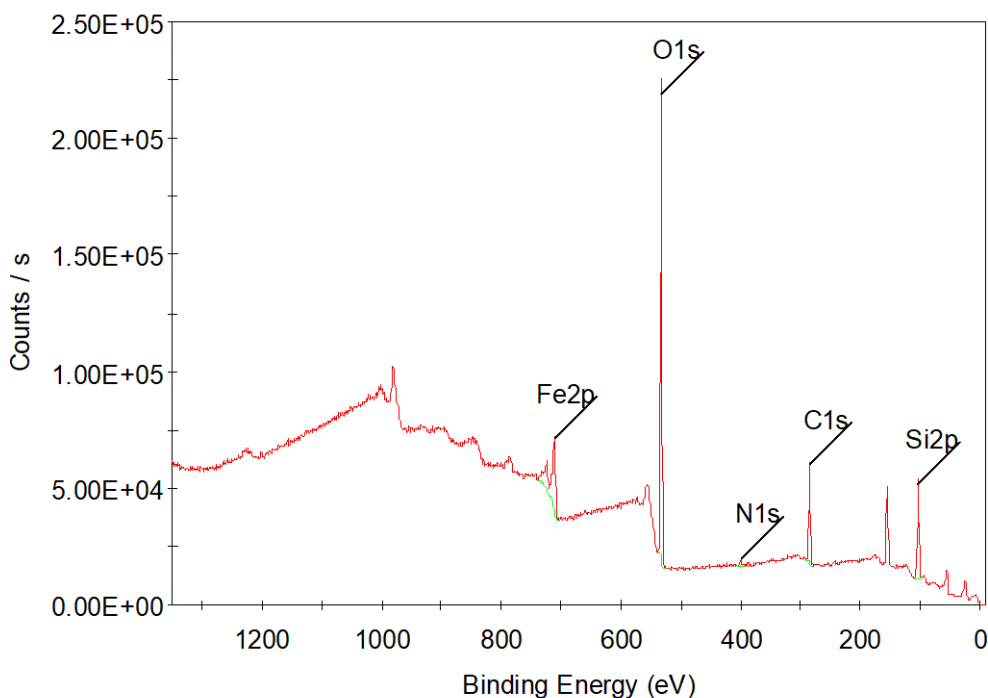


Figura 14. Espectro de XPS de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2\text{-NH}_2$.

Los datos son congruentes con los valores que se reportados para $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ en la literatura⁷³.

5.6.6 Potencial ζ

Mediante el potencial ζ se logra describir la intensidad el campo eléctrico estático de la capa de solvatación entre la partícula y el fluido⁷⁴. Cuando las partículas en suspensión tienen elevado potencial $\zeta \geq 30$ mV (negativo o positivo), estas se repelen y el sistema no floculará, por el contrario, si es pequeño (≤ 30 mV) el potencial ζ el sistema floculará. Estos se considera que la suspensión es estable en el tiempo⁷⁵.

El análisis del potencial zeta, de las nanopartículas en distintas fases de la síntesis, se puede observar en la Tabla 4. Como se aprecia en dicha tabla, la carga superficial de las nanopartículas de Fe_3O_4 , fue negativa con un valor de -23.5 mV. En un siguiente paso de la síntesis del *core shell*, tras la adhesión del SiO_2 , el potencial ζ

fue aun negativo, pero con una ligera tendencia a lo positivo, -22.1 mV. En un último análisis del nanomaterial, esta vez con una amina en la superficie, se obtuvo una distribución de la carga de +13.4 mV, lo que comprueba la adición de los grupos amino del APTES, ya que la amina protonada aporta cargas positivas.

Tabla 4. Distribución las cargas para Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2\text{-NH}_2$

	Fe_3O_4	$\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2$	$\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2\text{-NH}_2$
Potencial ζ (mV)	-23.5	-22.1	13.4
Desviación std (mV)	± 1.87	± 3.81	± 4.13

Tras el uso de esta técnica, se pudo corroborar la presencia del grupo amino en la superficie de la nanopartícula $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, con lo cual, se procedió a la inmovilización de las enzimas lacasas.

5.7 Inmovilización de lacasas en las nanoestructuras *core shell* sintetizadas.

Se realizó una comparación entre la inmovilización de enzimas lacasas de *Trametes versicolor* en dos presentaciones diferentes, la primera, con enzimas comerciales de Sigma Aldrich liofilizadas, y en segundo, las cuales son el objetivo del proyecto, obtenidas por fermentación sumergida de *Trametes versicolor* nativo de la región y parcialmente purificadas por ultrafiltración, ambas inmovilizadas en nanopartículas modificadas de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2$. Lo anterior con la finalidad de tener datos que permitan probar la eficiencia.

En la Tabla 5, se muestran los valores correspondientes a cada una de las inmovilizaciones, siendo la actividad enzimática inicial (AE_i) la determinada a la solución de lacasa antes de la inmovilización y la actividad enzimática final (AE_f) que se logró inmovilizar a las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2\text{-NH}_2$. Con estos datos se puede calcular el porcentaje de retención para cada muestra.

Los porcentajes de inmovilización son considerablemente buenos $> 70\%$, si lo relacionamos con lo reportado con diferentes autores, como es el caso de Zhu y Kaskel, quienes, en 2007, realizaron la inmovilización de lacasas de *Trametes versicolor* en nanoestructuras de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MSS-NH}_2$ obteniendo el 60% de inmovilización, esto bajo condiciones muy similares a las del presente proyecto. Otro

caso es el del equipo de Qing Chang, en 2013, lograron un 80% de inmovilización de peroxidasas de rábano en un core shell $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$.

Tabla 5. Tabla comparativa entre actividad enzimática inicial (U/mL), actividad enzimática final (U/mL), capacidad de retención (U/g) y porcentaje de retención de lacasas inmovilizadas (%)

MUESTRA	AE _i U/mL	AE _F U/mL	RETENCIÓN %	CAPACIDAD DE RETENCIÓN (U/g SOPORTE)
Lacasa comercial Inmovilizada	1,900	1,312	69%	131.3
Lacasa parcialmente purificada e Inmovilizada	1,900	1,367	71%	136.7

5.8. Degradación y determinación de ciprofloxacino por HPLC

Cañas y Camarero (2010) señalan que “las lacasas pueden catalizar la oxidación de fenoles, anilinas y tioles aromáticos, los cuales son sustituidos en un proceso dependiente del O_2 ”. Al utilizar mediador redox como ABTS se genera una transferencia de electrones en la que el ABTS es oxidado por las lacasas, generando así, radicales que posteriormente contribuirán con la oxidación de sustratos no fenólicos⁵⁰.

Se montaron 3 diferentes experimentos, por triplicado en los cuales la variación fue de la presentación de la enzima lacasa, es decir, en un primer experimento se analizó el potencial de degradación que mantenía las lacasas obtenidas por fermentación, semipurificadas e inmovilizadas en las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$, para el segundo fue un experimento “control” el cual contenía lacasas comerciales de *Sigma Aldrich* que fueron dispuestas en solución bajo las mismas condiciones, y por último, el tercer análisis fue de lacasas libres, obtenidas por fermentación y semipurificadas.

Para cada uno de los experimentos la determinación por HPLC, se realizó a una longitud de onda de 276 nm, la cual es la longitud a la que absorbe la molécula de ciprofloxacino.

Como se aprecia en la Figura 16 la concentración inicial de ciprofloxacino en cada reactor fue de 20 ppm, las cuales fueron determinadas como hora cero de la degradación. En la hora cuarenta y ocho se observó un aumento de ± 2.0 veces la concentración inicial, existiendo algunas diferencias respecto a cada experimento.

Dicho aumento en la concentración, es debido a que las longitudes de onda de los subproductos iniciales, oscilan dentro de la misma longitud de onda de ciprofloxacino. Cuando la mineralización va lo suficientemente avanzada, es cuando

se forman iones fluoruro e iones de amonio, los cuales provocaran que los productos que restan de esta transformación absorban a una longitud de onda un tanto variada al espectro de la molécula de ciprofloxacino⁷⁶. Según indica Wetzstein *et al*, el primero y el segundo subproducto, identificados en las primeras horas de la degradación, y que cuentan con mayor presencia, absorben a 276 nm, para el tercero se reporta una longitud de onda de 272 nm.

Como es reportado por diferentes autores como Meritxell Gros y colaboradores, los productos de transformación se atribuyeron principalmente a la oxidación, hidroxilación y escisión del anillo de piperazina⁷⁷.

Dicho lo anterior y haciendo una comparación entre los tres experimentos realizados, se puede concluir que, el experimento control, de lacasa comercial, y el experimento de lacasa libre obtenida por fermentación y semipurificada, tuvieron un comportamiento prácticamente igual. Sin embargo, la ventaja de la enzima inmovilizada, es que las lacasas inmovilizadas en $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, fueron recuperadas pensando en la probabilidad de realizar otro ciclo de degradación, el cual por cuestiones de tiempo fue imposible llevar a cabo.

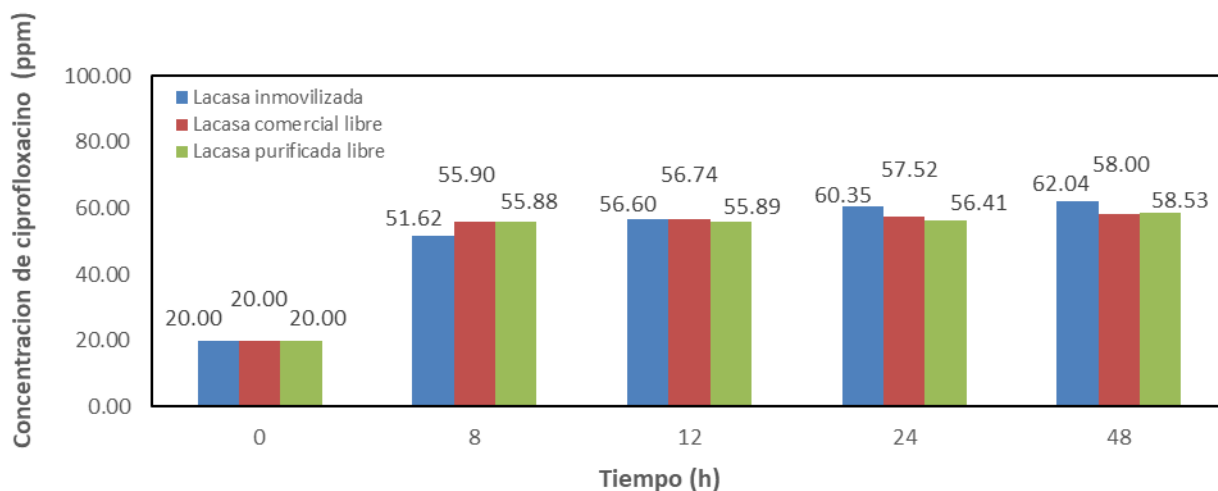


Figura 15. Concentración de ciprofloxacino en partes por millón vs tiempo en horas, durante la biotransformación con lacasas libres e inmovilizadas.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

Se obtuvo un extracto enzimático de lacasa con una actividad de 1,1125 U/mL, tras la purificación y concentración se logró aumentar a 26,160 U/mL.

De acuerdo con los resultados de TEM y SEM, se logró sintetizar una nanoestructura tipo *core shell* de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ a partir de nanopartículas comerciales de Fe_3O_4 .

Se identificaron la presencia de enlaces O-Si-O, Si-O, Fe-O en FTIR-ATR, lo cual confirman la existencia de los elementos en las nanopartículas.

Mediante XPS se detectó la presencia de los elementos del $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, destacando el C del grupo etoxi y el N de la amina del APTES.

El cambio generado en potencial zeta (ζ), después de la funcionalización con el APTES, se atribuye a la adición del grupo amino.

El *core shell* sintetizado mantiene la estructura cristalina del Fe_3O_4 de acuerdo con el resultado obtenido por DRX, y no perdió sus propiedades magnéticas.

Se logró inmovilizar la lacasa parcialmente purificada de *Trametes versicolor* nativo, así como de una enzima comercial, con porcentajes similares de retención.

La degradación de ciprofloxacino con lacasas purificadas inmovilizadas, lacasas purificadas libres, y lacasas comerciales libres, mas ABTS como mediador, no mostraron diferencia entre los resultados.

Por su parte, la detección de la degradación por HPLC con detector de UV-Vis, resulto en aumento

6.1. Recomendaciones y perspectivas a futuro

Se recomienda desarrollar un método analítico que permita medir adecuadamente la degradación enzimática de ciprofloxacino, o bien usar HPLC acoplado a un detector de masas. Además, probar diferentes mediadores redox para la degradación, así como determinar los ciclos de reuso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Becerril Bravo, J. E. Contaminantes emergentes en el agua. *Rev. Digit. Univ.* **10**, 1–7 (2009).
2. Villaseñor-basulto, D. L., Juan, R. & Rojas, P. Remoción de Ciprofloxacina presente en Aguas Sintéticas empleando Moringa oleífera como Coagulante Natural. 1–29
3. Costanzo, S. D., Murby, J. & Bates, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. in *Marine Pollution Bulletin* (2005). doi:10.1016/j.marpolbul.2004.10.038
4. Fournier, P.-E. *et al.* Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat. Rev. Microbiol.* (2013). doi:10.1038/nrmicro3068
5. Kaplan, E., Ofek, M., Jurkevitch, E. & Cytryn, E. Characterization of fluoroquinolone resistance and qnr diversity in Enterobacteriaceae from municipal biosolids. *Front. Microbiol.* (2013). doi:10.3389/fmicb.2013.00144
6. Klavarioti, M., Mantzavinos, D. & Kassinos, D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment International* (2009). doi:10.1016/j.envint.2008.07.009
7. Becker, D. *et al.* Removal of antibiotics in wastewater by enzymatic treatment with fungal laccase – Degradation of compounds does not always eliminate toxicity. *Bioresour. Technol.* **219**, 500–509 (2016).
8. Pan, L. jia *et al.* Study of ciprofloxacin biodegradation by a *Thermus* sp. isolated from pharmaceutical sludge. *J. Hazard. Mater.* **343**, 59–67 (2018).
9. Wei, L. *et al.* Kinetics and equilibrium of adsorption of dissolved organic matter fractions from secondary effluent by fly ash. *J. Environ. Sci.* (2011). doi:10.1016/S1001-0742(10)60597-9
10. Ding, H. *et al.* Simultaneous removal and degradation characteristics of sulfonamide, tetracycline, and quinolone antibiotics by laccase-mediated oxidation coupled with soil adsorption. *J. Hazard. Mater.* **307**, 350–358 (2016).
11. Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Cruz-Morató, C., Caminal, G. & Vicent, T. Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *J. Hazard. Mater.* (2010). doi:10.1016/j.jhazmat.2009.11.112
12. Pollegioni, L., Tonin, F. & Rosini, E. Lignin-degrading enzymes. *FEBS Journal* (2015). doi:10.1111/febs.13224
13. Asgher, M. *et al.* Laccase mediated decolorization of vat dyes by *Coriolus versicolor* IBL-04. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* (2008). doi:10.1016/j.ibiod.2008.05.003
14. Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F. & Wahab, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* (2015). doi:10.1080/13102818.2015.1008192

15. Brena, B., Gonzalez-Pombo, P. & Batista-Viera, F. Immobilization of enzymes: A literature survey. *Immobil. Enzym. Cells Third Ed.* (2013).
16. Barceló, L. D. & López de Alda, M. J. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. in 26
17. Oficina regional de la FAO para america latina y el caribe. Prevencion de la contaminacion del agua en la agricultura y actividades afines. in *Prevencion de la contaminacion del agua en la agricultura y actividades afines* 381 (Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación FAO, 1992).
18. Janet, M. *et al.* Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos Emerging contaminants in waters: effects and possible treatments Contaminantes emergentes em águas, efeitos e possíveis tratamentos. *Prod. + Limpia* **7**, 52–73 (2012).
19. Petrović, M., Gonzalez, S. & Barceló, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **22**, 685–696 (2003).
20. Wang, J., He, B. & Hu, X. Human-use antibacterial residues in the natural environment of China: implication for ecopharmacovigilance. *Environ. Monit. Assess.* **187**, 1–14 (2015).
21. Moron, Francisco J., Dra. Rodriguez, M. L. *Farmacología General.* (2002).
22. Seija, V. & Vignoli, R. TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA Principales grupos de antibióticos. 631–648 (2010). doi:10.3109/02688697.2011.626876
23. Hassouan, M. K. *Desarrollo de nueva metodología analítica para la determinacion de quinolonas en alimentos de origen animal. Tesis Doctoral* (2006).
24. Cué Brugueras, M., Morejón García, M. & Salup Díaz, R. Actualidad de las quinolonas. *Rev. Cuba. Farm.* **39**, (2005).
25. Suárez Olivares, A. & Vera Vidal, V. Ciprofloxacin use and overuse. *Medisan* **15**, 384–392 (2011).
26. Tanya, E. & Mancilla, P. Universidad De Guayaquil Tutor : 83 (2019).
27. Dreser, A., Wirtz, V. J., Corbett, K. K. & Echániz, G. Uso de antibióticos en México: Revisión de problemas y políticas. *Salud Publica Mex.* **50**, (2008).
28. Hughes, S. R., Kay, P. & Brown, L. E. Impact of anti-inflammatories, beta-blockers and antibiotics on leaf litter breakdown in freshwaters. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2016). doi:10.1007/s11356-015-5798-3
29. Rahman, S. Z., Khan, R. A., Gupta, V. & Uddin, M. Pharmacoenvironmentology - A component of pharmacovigilance. *Environmental Health: A Global Access Science Source* (2007). doi:10.1186/1476-069X-6-20
30. Mauricio, D. & Prieto, Q. Impacto ambiental de los medicamentos . Una aproximación desde el pensamiento ambiental (tesis maestría) Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. 1–147 (2016).
31. Daughton, C. G. & Ruhoy, I. S. Environmental footprint of pharmaceuticals: The significance

of factors beyond direct excretion to sewers. *Environmental Toxicology and Chemistry* (2009). doi:10.1897/08-382.1

32. Carlsson, C., Johansson, A. K., Alvan, G., Bergman, K. & Kühler, T. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants?. Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci. Total Environ.* **364**, 67–87 (2006).
33. Tejada, C., Quiñonez, E. & Peña, M. Contaminantes Emergentes en Aguas: Metabolitos de Fármacos. Una Revisión. *Rev. Fac. Ciencias Básicas* **10**, 80 (2014).
34. Herrmann, H. & Bucksch, H. Contaminant. *Dict. Geotech. Eng. Geotech.* 286–286 (2014). doi:10.1007/978-3-642-41714-6_34498
35. CENTA. Manual de depuración de aguas residuales urbanas. *Centa, Secr. Alianza por el agua, Ecol. y Desarro.* 264 (2008). doi:Z-2802/08
36. Ronzano, E. & Dapena, J. L. Tratamiento biológico de las aguas residuales. *Ediciones Diaz Santos, 1995* (1995).
37. Corrales, L. C., Antolinez Romero, D. M., Bohórquez Macías, J. A. & Corredor Vargas, A. M. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova* **13**, 55 (2015).
38. Giraldo, G. *et al.* La fotocatalisis como alternativa para el tratamiento de aguas residuales. *Rev. Lasallista Investig.* **1**, 83–92 (2004).
39. Valencia, S. H., Marín, J. M. & Restrepo, G. M. Efecto del pH en la Degradación Fotocatalítica de Materia Orgánica Natural. *Inf. Tecnol.* (2011). doi:10.4067/S0718-07642011000500008
40. Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón, A. & Cañizares-Villanueva, R. O. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **48**, 179–187 (2006).
41. García, J. M. C. Utilización de hongos de podredumbre blanca en la producción de pasta de celulosa de alto rendimiento. 160 (2015).
42. Alonso Mezquita. [Tratamiento Biologico De Aguas Residuales a Base De Enzimas Y Bacterias]. *J. Vis. Lang. Comput.* **11**, 287–301 (2000).
43. Of, P., Enzymes, L., Basidiomycete, F., On, F. & Materials, L. Producción De Enzimas Ligninolíticas Con Hongos Basidiomicetos Cultivados Sobre Materiales Lignocelulósicos Production of Ligninolytic Enzymes From Basidiomycete Fungi on Lignocellulosic Materials. *Vitae* **13**, 61–67 (2006).
44. Gianfreda, L., Xu, F. & Bollag, J. M. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediat. J.* (1999).
45. Rodríguez Sánchez, E. Caracterización molecular de lacasas de *Pleurotus eryngii*: expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes aromáticos. *Tesis* 157 (2006).

46. Rojas Verde, M. G. Producción de enzimas lignolíticas por hongos de pudrición blanca aislados en Nuevo León. 222 (2010). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
47. Montiel P. Carmina, B. J. I. Procesos enzimáticos amigables con el ambiente. *ISSN: 1607-6079* Vol. 15, N° 11 (2014).
48. Miguel Arroyo. Inmovilización de enzimas: Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Avances* **4**, 30 (2010).
49. Dulce, A. P. Diseño de nanopartículas de quitosano con actividad peroxidasa para la degradación de contaminantes Ambiental. (2015).
50. Prieto, A., Möder, M., Rodil, R., Adrian, L. & Marco-Urrea, E. Degradation of the antibiotics norfloxacin and ciprofloxacin by a white-rot fungus and identification of degradation products. *Bioresour. Technol.* **102**, 10987–10995 (2011).
51. Chang, Q. & Tang, H. Immobilization of horseradish peroxidase on NH₂-modified magnetic Fe₃O₄/SiO₂ particles and its application in removal of 2,4-dichlorophenol. *Molecules* **19**, 15768–15782 (2014).
52. Sutar, R. S. & Rathod, V. K. Ultrasound assisted Laccase catalyzed degradation of Ciprofloxacin hydrochloride. *J. Ind. Eng. Chem.* **31**, 276–282 (2015).
53. Taheran, M. *et al.* Covalent Immobilization of Laccase onto Nanofibrous Membrane for Degradation of Pharmaceutical Residues in Water. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **5**, 10430–10438 (2017).
54. Alvarado Ramírez, L. Inmovilización de Lacasas en esferas de SiO₂ para la degradación de rojo congo. 119 (2015). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
55. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* (1976). doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
56. Campos Téllez. Efecto del tipo de cofactor y concentración de cosustrato en la producción de lacasas con un *Trametes versicolor* nativo del noreste de México para la degradación de colorantes textiles. UANL, Facultad De Ciencias Químicas (2018).
57. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* (1998). doi:10.1016/S0076-6879(99)99017-1
58. Bryjak, J. & Rekuć, A. Effective purification of cerrena unicolor laccase using microfiltration, ultrafiltration and acetone precipitation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2010). doi:10.1007/s12010-009-8791-9
59. Wang, B. *et al.* Purification and characterization of a laccase from *Coprinopsis cinerea* in *Pichia pastoris*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* (2014). doi:10.1007/s11274-013-1540-9
60. Prinz, A., Hönig, J., Schüttmann, I., Zorn, H. & Zeiner, T. Separation and purification of laccases from two different fungi using aqueous two-phase extraction. *Process Biochem.* (2014). doi:10.1016/j.procbio.2013.11.006

61. Guo, X., Mao, F., Wang, W., Yang, Y. & Bai, Z. Sulfhydryl-Modified Fe₃O₄@SiO₂ Core/Shell Nanocomposite: Synthesis and Toxicity Assessment in Vitro. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 14983–14991 (2015).
62. Zhu, Y., Kaskel, S., Shi, J., Wage, T. & Van Pée, K. H. Immobilization of *Trametes versicolor* laccase on magnetically separable mesoporous silica spheres. *Chem. Mater.* **19**, 6408–6413 (2007).
63. Hassani, A., Khataee, A., Karaca, S., Karaca, C. & Gholami, P. Sonocatalytic degradation of ciprofloxacin using synthesized TiO₂ nanoparticles on montmorillonite. *Ultrason. Sonochem.* **35**, 251–262 (2017).
64. Bonnarme, P., Delattre, M., Drouet, H., Corrieu, G. & Asther, M. Toward a control of lignin and manganese peroxidases hypersecretion by *Phanerochaete chrysosporium* in agitated vessels: Evidence of the superiority of pneumatic bioreactors on mechanically agitated bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* (1993). doi:10.1002/bit.260410407
65. Unidad-iztapalapa, M., Biotechnología, D. De & Federal, D. Efecto de la fuente de carbono en el crecimiento de *Escherichia coli* TOP10. 9340
66. Efecto de la glucosa y nitrato de amonio sobre las enzimas ligninolíticas producidas por *Trametes versicolor* inmovilizado en espuma y la decoloración de un efluente papelerero en un biorreactor de lecho fluidizado. *Univ. Sci.* (2005).
67. Gascón, V., Márquez-Álvarez, C. & Blanco, R. M. Efficient retention of laccase by non-covalent immobilization on amino-functionalized ordered mesoporous silica. *Appl. Catal. A Gen.* (2014). doi:10.1016/j.apcata.2014.05.035
68. Rodríguez, S., Fernández, M., Bermúdez, R. C. & Morris, H. Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. *Rev. Iberoam. Micol.* **20**, 164–168 (2003).
69. Gutierrez Soto, Purificación y Caracterización Parcial de las Lacasas de *Trametes maxima* CU1 y su Aplicación en la Degradación de Colorantes Textiles. *UANL- FCQ* (2009).
70. Rodríguez López, A. Estudio de la síntesis y caracterización de nanopartículas de magnetita por métodos electroquímicos. 166 (2012).
71. McCabe, W. L., Smith, J. C. & Harriott, P. *Operaciones unitarias en ingeniería química*. McGraw-Hill/Interamericana editores, S.A de C.V (2017).
72. Morejón-Alonso, L., Savón, L., Masso, J. & Diaz-Aguila, C. Nanopartículas magnéticas de óxido de hierro para el aislamiento de ADN plasmídico. **32**, 195–217 (2020).
73. Lian, S. *et al.* Convenient synthesis of single crystalline magnetic Fe₃O₄ nanorods. *Solid State Commun.* (2003). doi:10.1016/S0038-1098(03)00580-5
74. Clogston, J. D. & Patri, A. K. Zeta potential measurement. *Methods Mol. Biol.* (2011). doi:10.1007/978-1-60327-198-1_6
75. Salas Ambrosio, P. J. Síntesis Y Caracterización De Nanopartículas Magnéticas Funcionalizadas Con Tetraetil Ortosilicato Y Recubiertas Con Acrilatos Para Uso Como Vehículo De Doxorubicina. 86 (2013).

76. Calza, P., Medana, C., Carbone, F., Giacotti, V. & Baiocchi, C. Characterization of intermediate compounds formed upon photoinduced degradation of quinolones by high-performance liquid chromatography / high-resolution multiple-stage mass spectrometry. 1533–1552 (2008). doi:10.1002/rcm
77. Gros, M. *et al.* PT SC AC. *Water Res.* (2014). doi:10.1016/j.watres.2014.04.042